

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung



Aktenzeichen: 198 57 529.7
Anmeldetag: 14. Dezember 1998
Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg/DE
Bezeichnung: Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten, von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen
IPC: G 01 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. Oktober 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

Kahle

BEST AVAILABLE COPY

PATENTANWALTSKANZLEI

LIERMANN - CASTELL

Schillingsstraße 335
D - 52355 Düren
Tel.: (0 24 21) 6 30 25
Fax: (0 24 21) 6 49 04



Liermann - Castell · Schillingsstraße 335 · 52355 Düren · Germany

Einschreiben

Deutsches Patentamt
Zweibrückenstraße 12

80297 München

Ihre Zeichen.
allgemeine Vollmacht Nr.

Mein Zeichen
1103 /SO

Dipl.-Ing. Manfred Liermann
Patentanwalt 1980 - 1994

Dipl.-Ing. Klaus Castell
Patentanwalt, European Patent Attorney,
European Trademark Attorney

Dipl.-Phys. Martin Reuther
Patentanwalt,
European Trademark Attorney

Stadtsparkasse Düren (BLZ 395 500 00)
Kto.-Nr. 138 180
VAT DE 811 708 918

in Zusammenarbeit mit den Patentanwälten
Dr. B. Huber, Dipl.-Biol.
Dr. A. Schüssler, Dipl.-Chem.
Truderingerstr. 246 · 81825 München

11. Dezember 1998

Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

Patentanmeldung

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des Öffentlichen Rechts
In Neuenheimer Feld 280
D-69210 Heidelberg

Titel: Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer
Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reak-
tionen und Brechungsverhalten, von auf einem Träger
gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen
Molekülen

5
14.12.98

- 1 -

Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer Eigenschaften,
insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten, von
auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen
Molekülen

5

10

15

20

Die Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten, von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen. Dabei wird hier der Begriff "Eigenschaften" im weitesten Sinne verstanden und soll nicht nur die für bestimmte Moleküle charakteristischen Eigenschaften, wie zum Beispiel deren Massenspektrogramm, umfassen, sondern zum Beispiel auch die Fähigkeit, überhaupt – nämlich durch das bloße Vorhandensein – eine bestimmte Reaktion zu zeigen, so daß die Erfindung also auch solche Verfahren und Vorrichtungen betrifft, bei denen aus einer bestimmten optischen Reaktion zunächst nur auf das bloße Vorhandensein eines Stoffes – nicht aber dessen Art – geschlossen werden soll (wobei dann die Art des Stoffes zum Beispiel aus dessen Position auf dem Träger ermittelt wird). Unter dem Begriff "biologische" Moleküle werden hier alle Arten von in der Biologie, der Pharmazie und der Medizin besonders relevanten Molekülen verstanden, also z.B. Peptide, D-Peptide, L-Peptide und Mischungen daraus, natürlich vorkommende Oligonukleotide, ihre Spiegelbilder und Mischungen daraus, künstlich derivatisierte Oligonukleotide, wie sie zum Aufbau von Aptameren eingesetzt werden, Oligosac-

charide und Modifikationen der genannten Moleküle. Insbesondere modular aufgebaute Oligomere, die nicht in der Natur vorkommen, können dabei besondere pharmakologische Relevanz besitzen. Besonders seien in diesem Zusammenhang auch mithilfe chemischer Kombinatorik herzustellende nichtnatürliche Substanzen erwähnt, die als Liganden von biologischen Molekülen eingesetzt werden können, insbesondere organische Verbindungen, Steroidderivate usw. Aus einer Vielzahl solcher Moleküle können spezifische Binder für ein natürlich vorkommendes Molekül isoliert werden, die die Aktivität dieses Moleküls modifizieren. Da diese Binder dann jedoch oft von natürlich vorkommenden Verdauungsenzymen nicht gespalten werden können, eignen sie sich in besonderem Maße für den Einsatz als Therapeutikum.

Solche Verfahren und Vorrichtungen sind in unterschiedlichster Form bekannt, weisen jedoch sämtlich bestimmte Nachteile auf. So benötigen die bekannten Verfahren zu ihrer Durchführung aufwendige und teure Spezialgeräte und sind vergleichsweise langsam im Auslesen eines Lumineszenzsignals. Insbesondere wenn – was, wie nachfolgend noch erläutert wird, aus unterschiedlichen Gründen vorteilhaft ist – sehr viele unterschiedliche Molekülgruppen auf einem gemeinsamen Träger angeordnet und einzeln zu untersuchen sind, muß zum Anfahren der einzelnen Molekülgruppen eine sehr aufwendige Mechanik verwendet werden, die nicht nur teuer und stör-anfällig ist, sondern die auch bei höchster Präzisionsarbeit immer Fertigungstoleranzen aufweist, die um etliche Größenordnungen höher liegen, als die für eine Untersuchung ausreichende minimale Größe der Molekülgruppen. Dadurch ist die Anzahl der auf einem Träger maximal unterzu-

bringenden Moleküle bzw. Molekülgruppen bei den bekannten Verfahren und Vorrichtungen begrenzt und liegt etwa in der Größenordnung einiger 10^5 Molekülgruppen. Insbesondere für bestimmte Blutserums- oder DNA-Analysen wäre es jedoch wünschenswert, wenn auf einem Träger etwa 10^8 bis 10^9 Moleküle aufgebracht und untersucht werden könnten.

Zum Aufbringen der Moleküle auf die jeweiligen Träger, insbesondere auf sogenannte "Diagnostik-Chips", sind lithographische Methoden bekannt, wobei jedoch – ähnlich wie bei der späteren Untersuchung – die schwierige exakte Zuordnung von Molekül und wiederholbar gezielt anfahrbarer Trägerposition die Zahl der maximal aufbringbaren Moleküle begrenzt, denn es genügt nicht, sehr viele unterschiedliche Moleküle dicht gepackt auf einem Träger anzuordnen, ohne jedoch wiederholbar genau zu wissen, welche Moleküle sich an welcher Position auf dem Träger befinden. Insbesondere ist es bei den bekannten Verfahren und Vorrichtungen ein Problem, sehr viele Lumineszenzreaktionen auf einem Träger in angemessener Zeit und gleichzeitig auch sehr genau auszulesen. Bei den mit den hier betroffenen Verfahren und Vorrichtungen vorteilhaft durchführbaren Färbeuntersuchungen, bei denen ein zu untersuchender Stoff auf den Träger, auf dem zuvor bereits unterschiedliche Moleküle verankert worden sind, aufgebracht wird, sollen Rückschlüsse auf die in dem zu untersuchenden Stoff vorhandenen Substanzen, wie z.B. bestimmte Antikörper in einem Blutserum, daraus gezogen werden, mit welchen der auf dem Träger verankerten Moleküle der Stoff bzw. dessen Bestandteile Bindungen eingegangen sind, so daß man sehr genau wissen muß, welches Molekül sich wo auf dem Träger befindet.

- Schließlich können bei den bekannten Vorrichtungen und Verfahren die einmal aufgebrachten Moleküle in der Regel gar nicht oder nur mit sehr großem Aufwand wieder abgelöst werden. Insbesondere wenn sich auf dem Träger eine sehr große Zahl von Molekülen (eine "Molekülbibliothek") befindet, die mit einem zu untersuchenden Stoff oder einem Gemisch von Stoffen (einer zweiten "Molekülbibliothek", zum Beispiel einem Proteingemisch) in Verbindung gebracht worden ist, wäre es oftmals wünschenswert, die Bindungspartner aus der zweiten Molekülbibliothek, also die Moleküle, die Bindungen mit Molekülen der ersten Molekülbibliothek eingegangen sind, gezielt von dem Träger ablösen und einer weiteren Untersuchung unterziehen zu können. Dies ermöglichte dann die parallele Identifizierung von Bindungspaaren aus den beiden Molekülbibliotheken, wobei der Bindungspartner aus der ersten Molekülbibliothek jeweils durch seine Position auf dem Träger bekannt ist, während der Bindungspartner aus der zweiten Molekülbibliothek nach der gezielten Ablösung von dem Träger identifiziert werden kann. Besonders vorteilhaft wäre es dabei, wenn zunächst diejenigen trägergebundenen Moleküle identifiziert werden könnten, die überhaupt Moleküle aus der zweiten Molekülbibliothek gebunden haben.
- Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, verbesserte Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen anzugeben, die zudem preisgünstig herstell- bzw. durchführbar sind. Nach

Möglichkeit sollen die Verfahren und Vorrichtungen auch noch besonders schnell durchführbar sein bzw. besonders schnell arbeiten.

Die Aufgabe wird zum einen gelöst von einem Verfahren zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger gebundenen Molekülen,

5 wobei elektromagnetische Wellen, insbesondere Laserlicht, auf den Träger eingestrahlt und im wesentlichen nur das von den Molekülen eventuell emittierte Licht von dem Detektor erfaßt wird. Dies hat gegenüber den bekannten Verfahren, die in der Regel nach dem Prinzip des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops arbeiten, bei welchen ein Teil des gestreuten 10 Anregungslichts auch auf den Detektor gelangt, den Vorteil, daß tatsächlich nur das emittierte Licht erfaßt und damit ein wesentlich verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt wird. Es sei an dieser Stelle betont, daß unter dem Begriff "Licht" hier alle Arten von elektromagnetischen Wellen verstanden werden, insbesondere also auch Wellen mit außerhalb des im 15 Empfindlichkeitsbereich des menschlichen Auges liegenden Wellenlängen.

Um nun ohne aufwendige Blenden o. dgl. sicherzustellen, daß tatsächlich möglichst nur das emittierte Licht zum Detektor gelangt bzw. von diesem erfaßt wird, kann zum einen so vorgegangen werden, daß die elektromagnetischen Wellen nur kurzzeitig, insbesondere gepulst, auf den Träger eingestrahlt werden und daß der Detektor während des Einstrahlens eventuell von den bestrahlten Molekülen emittiertes Licht nicht erfaßt, wobei hier unter dem Begriff "Erfassen" das Feststellen einer meßbaren Größe einschließlich des Erzeugens entsprechender, für die jeweilige Untersuchung verwertbarer Signale verstanden wird, so daß also auf den 20

eigentlichen Sensor des jeweiligen Detektors sehr wohl Licht gelangen kann, das nicht von einer Lumineszenz-Reaktion herrührt, solange nur z.B. durch Abschalten der dem Sensor nachgeschalteten Detektionseinrichtungen, insbesondere also der Signalerzeugung und -auswertung während des Einstrahlens der zur Lumineszenz anregenden elektromagnetischen Wellen - sichergestellt ist, daß dieses Licht nicht in störende Signale umgewandelt wird. Es sei an dieser Stelle betont, daß durch das kurzzeitige Anregen und das zeitlich verzögerte Auslesen der Lumineszenzreaktion in den Dunkelphasen der Anregung, das Signal- Rauschen-Verhältnis für alle Arten von Fluoreszenzmessungen verbessert werden kann, insbesondere bei Fluoreszenzmessungen nach dem Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops, bei der Detektion von chromatographisch aufgetrennten fluoreszenzmarkierten Molekülen, insbesondere beim Sequenzieren von DNA, und beim Fluoreszenz-aktivierten Zell-Sorter oder Zell-Scanner (FACS). Dies kann alternativ oder zusätzlich zum gepulsten Einstrahlen der Wellen in besonders vorteilhafter Weise dadurch erzielt werden, daß der Detektor und der Träger nach dem Einstrahlen oder während des Einstrahlens der elektromagnetischen Wellen relativ zueinander bewegt werden, insbesondere relativ zueinander gedreht werden, so daß sich die mit den elektromagnetischen Wellen bestrahlten Moleküle in einem von dem Detektor erfaßbaren Bereich bewegen. Schließlich können auch mehrere Lichtquellen und mehrere Detektoren verwendet werden, die wechselweise an- und abgeschaltet werden, so daß es vorteilhaft möglich wird, Moleküle in bestimmten Bereichen auf dem Träger durch Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen zur Lumineszenz anzuregen und gleich-

zeitig oder zeitversetzt eventuelle Lumineszenzreaktion aus anderen, zuvor angeregten Bereichen des Trägers zu erfassen.

Ein weiterer Ansatz das Signal-Rausch-Verhältnis von Lumineszenzsignalen zu verbessern gründet auf die Topographie eines Mischarrays von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen mit Leuchtdioden. Die einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden werden dabei in Vertiefungen angeordnet, so daß das von Ihnen abgestrahlte Licht nur bei benachbarten Siliziumerhebungen eine Lumineszenzreaktion anregt. Natürlich kann auch die Topographie des beschriebenen Mischarrays mit kurzzeitiger Anregung der Lumineszenzreaktion und einem Auslesen der Signale in der Dunkelphase verbunden werden. Die kurzzeitige Anregung von Fluoreszenzmolekülen ermöglicht darüber hinaus auch eine besonders einfache Zuordnung von Fluoreszenzsignalen an einzelne Moleküle einer Molekülbibliothek, wenn diese auf ein Array von Detektoren aufgebracht werden. Der in den Dunkelphasen der Anregung aufgrund der Lumineszenz der Moleküle entstehende Strom kann parallel in den einzelnen Photodetektoren ausgelesen werden und damit den einzelnen Mitgliedern der Molekülbibliothek zugeordnet werden.

Sowohl durch das beschriebene gepulste Einstrahlen/gepulste Detektieren als auch durch das Bewegen von Träger und Detektor relativ zueinander und durch das wechselweise Betreiben mehrerer Lichtquellen und Detektoren wird vorteilhaft eine Entkopplung von Anregung und Detektion erreicht, was gegenüber den bekannten Verfahren zu einem erheblich klareren Lumineszenzsignal und damit zu einem verbesserten Signal-Rausch-

Verhältnis führt. Letzteres kann noch weiter verbessert werden, wenn zwischen den Träger und den Detektor bzw. die Detektoren ein oder mehrere Wellenlängenfilter geschaltet werden, was es erlaubt, auch eventuelles Streulicht des zur Anregung benutzten Lichts vom Fluoreszenzlicht zu trennen.

5

Zur Lösung der Aufgabe wird ferner ein Verfahren zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen, angegeben, wobei elektromagnetische Wellen auf den Träger eingestrahlt, die bestrahlten Moleküle mit einem Detektor beobachtet werden, ausgewählte Moleküle von dem Träger automatisch abgelöst und einem zweiten Detektor zur Erfassung weiterer, nicht notwendigerweise optischer, Eigenschaften zugeführt werden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß nach einem ersten Analyseschritt (z.B. einer an sich bekannten Färbereaktion), bei dem bestimmte Moleküle mit auf dem Träger bereits zuvor gebundenen Molekülen Bindungen eingegangen sind und so neue Molekülkomplexe gebildet wurden, diese neuen Molekülkomplexe gezielt weiter untersucht werden können, wobei vom zweiten Detektor z.B. ein Massenspekrogramm der abgelösten Molekülkomplexe erzeugt werden kann.

10

15

20

Dabei kann so vorgegangen werden, daß die ausgewählten Moleküle durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, insbesondere durch Einstrahlung von Laserlicht, von dem Träger abgelöst werden, was für eine sehr große Zahl von Proben verhältnismäßig einfach und kostengünstig umgesetzt werden kann.

In besonders vorteilhafter Weise kann für die Ablösung von ausgewählten Molekülen ein Mischarray von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen und Leuchtdioden verwendet werden. Die einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden dienen dabei zum anregen benachbarter fluoreszenzmarkierter Moleküle und mit der Identifizierung von Bindungsereignissen zur Vorauswahl, welche Moleküle von dem Träger abgelöst und einem zweiten Detektor zugeführt werden sollen. Befinden sich diese Moleküle auf einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen, so können diese sehr einfach, insbesondere durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von dem Träger abgelöst werden.

So kann z.B. im Massenspektrometer der zunächst nicht bekannte Bindungspartner aus einer zweiten Molekülbibliothek an ein durch die Position auf dem Träger bereits bekanntes Mitglied aus der ersten Molekülbibliothek bestimmt werden, und zwar auch für mehrere Mitglieder parallel. Die Identität des Bindungspartners aus der zweiten Molekülbibliothek erhält man z.B. durch den Vergleich der Masse (oder tryptischer Spaltstücke eines gebundenen Proteins) mit den bekannten Sequenzen aus einem bereits sequenzierten Genom. Ein weiteres Beispiel ist die Ablösung eines rekombinanten Phagenantikörpers, der durch sein oberflächen-exprimierten Fv-Antikörper ein bekanntes Antigen gebunden hat. Mit diesem Phagenantikörper kann ein E.coli Bakterium infiziert und der rekombinante Antikörper anschließend produziert werden.

Ein weiteres Beispiel ist die Sequenzierung komplexer DNA mittels Festphasen-gekoppelter Oligos, bei der "in situ", d.h. parallel bei Millionen

verschiedener Oligos eine Sequenzierungsreaktion stattfindet. Verändert wird dabei das ursprünglich auf den Träger gekoppelte Oligo, es wird mit Hilfe einer Polymerase und eines Templates verlängert, bis ein von der Polymerase eingebautes ddNTP zum Kettenabbruch führt. Anstelle des 5 ursprünglich gekoppelten Oligos erhält man eine Schar von etwas längeren Oligos, die beispielsweise durch ein ddC terminiert sind. Diese Schar von veränderten Oligos muß man vom Template (z.B. durch Erhitzen) und dann noch vom Träger (beispielsweise durch den Einbau einer S=S-Brücke in das Verbindungsstück zum Träger, die mit Hilfe von reduzierenden 10 Agentien wie Mercaptoethanol spaltbar ist) abtrennen. Das Massenspektrometer ermittelt dann die Massen der einzelnen Mitglieder dieser Schar von ddC terminierten Oligos und durch den Vergleich mit den erwarteten Massen die Sequenz der Verlängerung.

Weiter wird die genannte Aufgabe gelöst von einem Verfahren der 15 ein- gangs genannten Art, bei welchem ein Träger mit integrierten und von einem Detektor erfaßbaren möglichst engmaschigen Positionsmarkierungen verwendet wird. Dies hat gegenüber den bekannten Verfahren den großen Vorteil, daß eventuelle Ungenauigkeiten des jeweiligen Verfahrensmechanismus nicht mehr zu falschen Untersuchungsergebnissen führen 20 müssen, da die in den Träger integrierten Positionsmarkierungen eine Kontrolle der tatsächlichen Position des Trägers relativ zu einem Detektor erlauben. Besonders vorteilhaft kann dabei als Träger eine im wesentlichen handelsübliche Compact Disc (CD), eine Digital Video Disc (DVD) oder Magneto Optical Disc (MOD) verwendet werden, die bereits über engma- 25 schige interne Positionsmarkierungen verfügen, was eine Positions-

bestimmung auf Mikrometer genau erlaubt, wobei sich die Verfahren zum Lesen und Prüfen der Markierungen auf diesen bekannten Trägern bereits bestens bewährt haben. Aufgrund der Ähnlichkeit von CD, DVD und MOD in Bezug auf die hier benötigten Eigenschaften wird im folgenden 5 der Einfachheit halber nur noch die CD genannt, womit immer auch DVD und MOD eingeschlossen sein sollen.

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendbaren CDs und Auslesegeräte sind im übrigen deutlich preisgünstiger als die bekannten Diagnostik-Chips.

10 Besonders vorteilhaft ist es, bei den oben beschriebenen Verfahren eine lichtdurchlässige Compact Disc zu verwenden. Dies erlaubt es nämlich, ein in an sich bekannter Weise zum Abtasten der Positionsmarkierungen verwendetes Laserlicht gleichzeitig zur Anregung von Lumineszenz-Reaktionen zu benutzen. Alternativ kann eine CD mit einem in die CD integrierten Wellenlängenfilter verwendet werden, wodurch ein Laser mit an sich bekannter Technik für die exakte engmaschige Positionsbestimmung eingesetzt werden kann, dessen Licht nicht auf die auf der anderen Seite der CD aufgebrachten oder aufzubringenden Moleküle gelangt. Für 15 die Synthese bzw. für das Auslesen der Lumineszenzreaktion kann dann ein anderer Laser verwendet werden, dessen Licht den genannten Wellenlängenfilter durchdringen kann. Dieser zweite Laser ist am ersten Laser fixiert, so daß mit der Positionsbestimmung des ersten Lasers automatisch 20 auch die Positionierung des zweiten Laserstrahls auf der CD bekannt ist.

Auch die bei Computern eingesetzten Flachbildschirme besitzen integrierte Positionsmarkierungen derart, daß die einzelnen LED/LCD Bildpunkte ganz genau bestimmten Positionen zugeordnet sind und einzeln ansteuerbar sind, so daß ein in nächster Nähe über den Leuchtdioden/Flüssigkristallen angebrachter durchsichtiger Träger für biologische Materialien an genau definierten Punkten beleuchtet werden kann. Dies gilt umso mehr, wenn die bisher eingesetzten Flüssigkristalle durch einen Array von möglichst dicht gepackten miniaturisierten Lasern oder Leuchtdioden ersetzt werden.

Eine besonders vorteilhafte Lösung gründet dabei auf die Topographie eines Mischarrays von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen mit den darauf aufgebrachten Molekülen mit Leuchtdioden. Die einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden werden dabei in Vertiefungen angeordnet, so daß das von Ihnen abgestrahlte Licht nur bei benachbarten Siliziumerhebungen eine Lumineszenzreaktion anregt. Auch damit ist eine wiederholbare exakte Zuordnung von Anregungslicht und aufgebrachten Molekülen möglich.

Die Verwendung eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden bzw. die Verwendung der genannten Mischarrays bietet die Möglichkeit, den Träger der biologischen Materialien während eines ganzen Zyklus - von der vorzugsweise lithographischen oder durch das Anlegen von einer Spannung vermittelten Synthese der Molekülbibliothek angefangen, über das Färben der Bibliothek mit einer zweiten Molekülbibliothek bis hin zum Auslesen der Bindungsergebnisse - über dem Array fixiert zu halten. Dies gewährleistet eine sehr einfache, sehr schnelle und dennoch wiederholt extrem genaue Ansteuerung der einzelnen Bildpunkte, wobei das zeit-

aufwendige Ansteuern und Fokussieren der einzelnen Bildpunkte entfällt. Die Möglichkeit, das Array von Leuchtdioden oder Mikrolasern mit Hilfe eines einfachen Abbildungssystems auf dem Träger in verkleinerter Form abzubilden, erlaubt darüber hinaus eine sehr hohe Packungsdichte der durch lithographische Synthesen aufgebrachten Molekülbibliotheken. Zu-
5 dem können Träger und Array anschließend getrennt werden, worauf das Array erneut eingesetzt werden kann.

Als Detektoren können z.B. Arrays von Photomultipliern, von PIN-Dioden, von Avalanche-Dioden oder eine sog. Multi Channel Plate verwendet werden. Die Detektoren können auch direkt in die Arrays aus Anregungslichtquellen eingelagert werden, dabei entstehen Mischarrays von Detektoren und Anregungslichtquellen.
10

Werden die zu untersuchenden Moleküle auf der einen Seite und die Positionsmarkierungen auf der anderen Seite der Compact Disc aufgebracht, so erlaubt es dies, die Anzahl der pro Flächeneinheit auf einem Träger in genau definierter und vor allem wieder auffindbarer Position anordbarer Moleküle gegenüber den bekannten Verfahren enorm zu steigern - konnten bislang etwa 10^5 Moleküle so auf einem Träger einer Größe einer CD vergleichbaren Größe so angeordnet werden, daß ihre Position exakt be-
20 stimmbar war, so können jetzt 10^8 bis 10^{10} auf einer CD angeordnet, exakt aufgefunden und gezielt untersucht werden. Ähnliches gilt beim Einsatz einer Art Flachbildschirm, insbesondere wenn die bisher gebräuchlichen Flüssigkristalle durch einen Array von Mikrolasern oder von Leuchtdioden ersetzt werden. Die genaue Positionsinformation ergibt sich in diesem Fall

durch die relative Anordnung der Mikrolaser zueinander, so daß genau definierte Punkte auf einem parallel über dem Flachbildschirm angeordneten vorzugsweise durchsichtigen Träger von Molekülbibliotheken beleuchtet werden können. Damit wird es erstmals möglich, sehr große Molekülbibliotheken auf einem einzigen, sehr handlichen Träger anzuordnen. Z.B. kann auf dem Träger eine vorzugsweise vollständige Peptidbibliothek, insbesondere eine 4-, 5-, 6- oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht sein; wobei der Träger nach dem Aufbringen der Peptidbibliothek z.B. mit einem zu untersuchenden Blutserum in Kontakt gebracht werden kann.

Ebenso ist es möglich, auf dem Träger eine vorzugsweise vollständige Oligonukleotidbibliothek, insbesondere eine 15mer Oligonukleotidbibliothek aufzubringen, wobei der Träger nach dem Aufbringen der Oligonukleotidbibliothek z.B. mit zu untersuchender, insbesondere fluoreszenzmarkierter und mit Hilfe von Zufallsoligonukleotidprimern vervielfältigter DNA in Kontakt gebracht werden kann. Damit ist es erstmals möglich, in einer einzigen Färbereaktion eine Blutserums- oder DNA-Probe auf sehr viele Infektions-, Autoimmun- bzw. Erbkrankheiten zu testen, wobei der Nachweis eventueller an Molekülen der Peptidbibliothek gebundener Serumantikörper in an sich bekannter Weise durch fluoreszenz-markierte Anti-Human-Antikörper erfolgen kann.

Die Erfindung schafft damit völlig neue diagnostische Möglichkeiten und steigert insbesondere auch die Chancen, diagnostische Marker und Therapeutika zu finden. Werden z.B. vollständige 6mer Peptidbibliotheken mit einer größeren Anzahl von Patientenserien in Verbindung gebracht und z.B. mittels einer Färbereaktion daraufhin untersucht, an welchen Peptiden sich

Bestandteile der Seren angelagert haben, so werden sich dabei Korrelationen zwischen Krankheit und gefärbten Peptiden ergeben. Dies liegt daran, daß jeder Mensch in seinem Blutserum ein sehr komplexes individuelles Muster von Antikörperreaktivitäten mit sich trägt, das insbesondere die Auseinandersetzung seines Immunsystems mit akuten, chronischen, verdeckten oder bereits überstandenen Krankheiten wiederspiegelt. Ein großer Teil der Antikörperreaktivitäten kann durch die spezifische Bindung an Penta- oder Hexapeptide definiert werden, wodurch bei der Analyse der Bindereaktivitäten an eine vollständige Penta- oder Hexapeptidbibliothek das o.g. individuelle Muster von Antikörperreaktivitäten in bisher nicht gekannter Komplexität bestimmt werden kann. Längere Bindemotive, insbesondere die ebenfalls häufig vorkommenden mit einer helikalen Struktur, können durch Bibliotheken ermittelt werden, in denen nicht jede Aminosäure zufällig ist, sondern nur jene an bestimmten, aus der Struktur abgeleiteten Positionen. Damit können neue diagnostische Marker und bisher unbekannte Korrelationen zwischen Krankheit und spezifischen Antikörperreaktivitäten gefunden werden, darunter z.B. Marker für Tumorerkrankungen, für Herz-Kreislauferkrankungen wie Herzinfarkt, für multiple Sklerose und Parkinson, für alle Arten von Autoimmunkrankheiten und Allergien und für alle Arten von Infektionskrankheiten.

Das entstehende Muster von Markern kann zum einen selbst durch die Korrelation zu bestimmten Krankheitsbildern die diagnostische Aussage ermöglichen. Die neu gefundenen Marker können aber auch gesondert auf Träger aufgebracht und bei künftigen Untersuchungen verwendet werden.

In analoger Weise kann auch versucht werden, Krankheiten zu Bindungsmustern an andere Molekùlbibliotheken, wie D-Peptidbibliotheken oder Oligosaccharidbibliotheken, zu korrelieren. Diese Methode ist dabei nicht auf menschliche Krankheiten beschràkt, sondern eignet sich zur Untersuchung forensischer und veterinärmedizinischer Fragestellungen ebenso wie zur Analyse anderer Flüssigkeiten, von Pflanzenextrakten bis hin zu Extrakten aus Mikroorganismen.

Bei einer weiteren Anwendung werden potentiell therapeutisch interessante Molekùle, wie z.B. D-Peptide, die nicht von den menschlichen Verdauungsenzymen abgebaut werden können, auf einem Träger angeordnet und anschließend mit medizinisch relevanten Molekùlen, insbesondere mit krankheitserreger-spezifischen Proteinen oder mit Mischungen von krankheitserreger-spezifischen Proteinen in Kontakt gebracht. Dies ermöglicht die gezielte und schnelle Suche nach Bindungspartnern an diese medizinisch relevanten Molekùle. Analog ist auch die Suche nach Enzymliganden, Enzymsubstrat-Analoga oder Enzyminhibitoren möglich.

Anschließend kann dann die Bindung an die medizinisch relevanten Molekùle detektiert werden, z.B. im Wege der Biotinylierung oder der Fluoreszenz-Markierung, so daß die D-Peptide oder Aptamere identifiziert werden können, die zumindest Teile des Krankheitserregers binden. Diese D-Peptide oder Aptamere können anschließend nacheinander daraufhin getestet werden, ob sie den Krankheitserreger hemmen. Hat man z.B. ein Enzym des Krankheitserregers (z.B. Protease von HIV, reverse Transcriptase etc.) in geeigneter Menge vorliegen, so kann dieses Enzym

fluoreszenz-markiert werden (entweder direkt oder durch die rekombinante Expression eines kleinen Peptid-tags, das mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers anfärbbar ist). Damit kann festgestellt werden, an welche D-Peptide das Enzym gebunden hat. Anschließend führt man eine weitere Färbereaktion durch, die durch die Enzymaktivität verursacht wird. Beispielsweise präzipitiert die Spaltung durch die HIV-Protease ein fluoreszierendes Peptid, das man nachweisen kann. So erhält man D-Peptide, die das Enzym nicht nur binden, sondern auch gleichzeitig hemmen.

- 10 Um nachzuweisen, an welchen der auf dem Träger gebundenen Moleküle sich Moleküle angelagert haben, kann das Blutserum oder die DNA nach oder vor dem In-Kontakt-Bringen des Trägers mit dem Blutserum oder der DNA mit einem mit dem Blutserum oder der DNA reagierenden, insbesondere Bindungen eingehenden Stoff in Kontakt gebracht werden. Zweckmäßigerweise wird dabei der mit dem Blutserum oder der DNA reagierende Stoff vor dem In-Kontakt-Bringen mit dem Serum oder der DNA mit einem zur Lumineszenz anregbaren Stoff, insbesondere einem durch Einstrahlung von Laserlicht zur Fluoreszenz anregbaren Farbstoff, eingefärbt. Solche Farbstoffe sind z.B. unter den Namen "Cy3", "Cy5", "FITC" oder "TRITC" im Handel erhältlich, wobei vorteilhaft bereits eine ganze Palette von Konjugaten dieser Fluoreszenz-Farbstoffe zur Verfügung steht (z.B. Ziege-Anti-Mensch-Antikörper konjugiertes Cy5).

Wird das zu untersuchende Blutserum mit einem für die Immunglobuline des Typs E spezifischen Nachweisreagenz in Kontakt gebracht, so lassen

- sich damit evtl. beim Patienten bestehende Allergien ermitteln, da die Immunglobuline des Typs E für die allergischen Reaktionen wie Asthma oder Heuschnupfen verantwortlich sind. Nicht-Allergiker haben praktisch keine IgEs in ihrem Blutserum, Allergiker unterschiedliche Mengen, die unterschiedliche Allergene erkennen lassen. Schließlich ermöglicht die Erfindung die Suche nach spezifischen Bindungspartnern für ein Zielmolekül aus einer Bibliothek von 10^8 bis 10^{10} unterschiedlichen Molekülen und damit - durch die gleichzeitige Identifizierung vieler (unterschiedlich stark bindender) Bindungspartner - nach den für die Bindung des Liganden an das Zielmolekül verantwortlichen Strukturparametern. Dadurch wird der Weg zu Leitstrukturen stark vereinfacht. Beispielsweise können dazu mit den oben genannten Methoden erhaltene Signalmuster automatisch mit Strukturparametern oder Strukturmodellen der identifizierten Liganden aus der benutzten Bibliothek korreliert werden.
- Um nun eine Peptidbibliothek auf einen Träger, insbesondere auf einen in einem der gerade beschriebenen Verfahren verwendbaren Träger, anzurichten, kann zunächst eine Oberfläche des Trägers mit einer Kunststoffschicht, die freie Aminogruppen für die Festphasensynthese einer Peptid- oder Oligonukleotidbibliothek enthält (z.B. dem derivatisierten Polystyrol "CovaLink" der Firma Nunc), überzogen werden (zur Einführung von primären Aminogruppen in Polystyrol siehe Fig. 15). Nach dem Einfügen eines geeigneten Spacers werden anschließend die freien Aminogruppen mit einer durch Licht abspaltbaren Schutzgruppe abgeblockt. Ein Beispiel von vielen für eine aktivierte, d.h. mit Aminogruppen reaktive, licht-abspaltbare Schutzgruppe ist Nitroveratryloxycarbonyl (NVOC).

Anschließend werden Schutzgruppen in bestimmten Bereichen des Trägers mittels eines Lasers abgespalten, worauf eine aktivierte Aminosäure, deren eigene Aminogruppe durch eine durch Licht abspaltbare Schutzgruppe blockiert ist, auf den Träger aufgebracht und dort verteilt wird, so daß die Aminosäure an die freien Aminogruppen ankoppeln kann. Danach werden die Verfahrensschritte "Abspalten von Schutzgruppen in bestimmten Bereichen des Trägers" und "Zuführen einer aktivierten Aminosäure, deren eigene Aminogruppe durch die durch Licht abspaltbare Schutzgruppe blockiert ist", für verschiedene, vorzugsweise alle 20 Aminosäuren wiederholt, und schließlich werden die Schutzgruppen von allen synthetisierten Peptiden abgespalten.

Alternativ kann auch eine andere lithographische Methode zum Aufbringen einer Peptidbibliothek angewandt werden. So können z.B. die ausgereiften konventionellen Standardsynthesen (z.B. Gebrauch von fMoc-Schutzgruppen bei der Peptidsynthese) mit einem Einschluß der aktivierten Monomere in photo- oder elektrolabile größere Partikel kombiniert werden. Die eingestrahlten elektromagnetischen Wellen bzw. eine angelegte Spannung spaltet dann nicht die photo- bzw. elektrolabile Schutzgruppe auf dem wachsenden Oligomer ab, sondern setzen die normalen aktivierten Monomere, wie sie für die Standardsynthesen verwendet werden, nur frei. Die aktivierten Monomere werden dabei vorzugsweise bei höherer Temperatur in einem Lösungsmittel gelöst, dessen Schmelzpunkt oder dessen Übergang in einen gel-artigen Zustand nahe bei 20 °C liegt, worauf ein Laserlicht absorbierender Farbstoff beigemengt, das Gemisch abgekühlt und bei tiefer Temperatur zu kleinen festen Partikeln zerrieben wird, die

über dem Träger für die lithographisch synthetisierten Molekülbibliotheken, zerstäubt werden. Die aktivierten Monomere werden aus diesen Partikeln lokal nur dort freigesetzt, wo ein Laser die Partikel aufgrund der Absorption des mit eingeschlossenen Farbstoffs erwärmt. Dadurch verflüssigen sich oder gelieren die Partikel und die aktivierten Monomere können in Lösung an die freien Aminogruppen (oder wie bei der Oligonucleotidsynthese an freie Hydroxylgruppen) koppeln. Direkt neben dem erwärmten Ort erstarrt die Flüssigkeit wieder.

Die Erwärmung der festen Partikel findet dabei besonders vorteilhaft mit Hilfe einer wiederholt kurzzeitig einstrahlenden Lichtquelle, insbesondere eines Lasers oder einer Leuchtdiode, statt, wodurch besonders scharf abgegrenzte Übergänge zwischen festen Partikeln und lokal aus den Partikeln freigesetzten Substanzen entstehen.

Alternativ zu schmelzenden Partikeln kann auch ein Cage-Einschluß, insbesondere in Fullerenen, oder eine andere Methode zur Freisetzung verwendet werden, die z.B. durch elektromagnetische Wellen oder eine elektrische Spannung auslösbar ist.

Ferner können alternativ auch ausgewählte Bereiche durch die in schneller Abfolge wiederholte Anlegung einer Spannung erwärmt werden, insbesondere wenn ein Mischarray von einzeln ansteuerbaren Silizium-erhebungen mit Leuchtdioden verwendet werden. Anstelle von aktivierten Monomeren können auch Kombinationen von Monomeren gekoppelt wer-

den, also beispielsweise alle 20×20 möglichen aktivierten Dimere von L-Aminosäuren.

Im nächsten Schritt werden die nicht gekoppelten Monomere, die nicht aufgeschlossenen Partikel und/oder die erstarrten Partikel entweder einfach weggeblasen, oder gelöst und weggewaschen, erneut feste Partikel, die aktivierte Monomere enthalten aufgebracht, in ausgewählten Bereichen an den Träger gekoppelt und dieser Schritt mit vorzugsweise allen zur Verfügung stehenden unterschiedlichen aktivierten Monomeren nacheinander durchgeführt, anschließend die aufgrund der erfolgten Kopplungen neu eingeführten Standardschutzgruppen mit bekannten Techniken abgespalten und der nächste Zyklus begonnen bis z.B. eine vollständige Peptidbibliothek synthetisiert wurde. Zusätzliche Modifikationen anderer Art durch andere chemische Reaktionen sind dabei auch möglich, insbesondere biologisch relevante Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen, oder Alkylierungen.

Eine weitere Möglichkeit bei der Verwendung eines Mischarrays von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen mit Leuchtdioden, ist die Steuerung der kombinatorischen Molekülsynthese durch das Anlegen einer Spannung in ausgewählten Bereichen. Dadurch werden entsprechend geladene aktivierte Monomere für die Molekülsynthese an ausgewählten Bereichen entweder abgestoßen oder angezogen.

Zum Aufbringen einer Oligonukleotidbibliothek auf einen der oben genannten Träger kann, analog zur Synthese der Peptidbibliothek vorgegangen

werden, mit dem Unterschied, daß anstelle der 20 verschiedenen aktivierten Aminosäuren nur 4 verschiedene aktivierte Nukleotide verwendet werden müssen. Geeigneterweise werden dafür vier verschiedene 3'-O-phosphoramide-aktivierte Deoxynucleoside verwendet, die am 5' Ende oder am 5 3' Ende eine photolabile Schutzgruppe tragen oder die, wie für die Synthese einer Peptidbibliothek beschrieben, in Partikel eingeschlossen über dem Träger zerstäubt und anschließend durch die Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen beweglich gemacht werden. Die für die Oligonukleotidsynthese üblicherweise verwendeten freien Hydroxylgruppen 10 können gleichzeitig mit dem Einfügen eines geeigneten Spacers eingeführt werden.

Analoge Methoden sind auch für die Herstellung von Aptamer-Bibliotheken einsetzbar, d.h. für auf Ribonukleotiden und ihren Derivaten beruhenden Oligomeren. Daneben können auch reaktive Moleküle anderer Art, wie sie 15 z.B. in der kombinatorischen Chemie benutzt werden, in die aktivierbaren Partikel eingeschlossen werden und ortsspezifisch freigesetzt werden. Somit können neben Nukleotiden oder Aminosäuren auch vielfältige andere Gruppen als monomere kombinierbare Bausteine für die Oligomersynthese verwendet werden.

20 Alternativ kann eine Molekülbibliothek auch durch eines von zahlreichen Druck- oder Spotverfahren auf den Träger aufgebracht werden, wie beispielsweise mittels einer Düse, ähnlich wie sie bei einem Tintenstrahldrucker benutzt wird. Anschließend können ausgewählte Bereiche des Trägers mit Laserlicht oder mit Hilfe von Leuchtdioden derart bestrahlt

werden, daß es in diesen Bereichen zu einer Verankerung der aufgebrachten Moleküle auf dem Träger kommt. Dies ist insbesondere deswegen vorteilhaft, weil dadurch später in genau demselben Bereich ein Lumineszenzsignal angeregt und ausgelesen wird, in dem vorher die aufgebrachten Moleküle aufgrund der Aktivität des Anregungslasers verankert wurden.

Um dies zu erreichen, kann z. B. vor dem Aufbringen der zu verankernden Molekülen eine bei den jeweiligen Umgebungstemperaturen feste Substanz auf den Träger gebracht werden, welche dann zur Verankerung der Moleküle geschmolzen wird. Dabei kann so vorgegangen werden, daß die Oberfläche eines Trägers (z.B. durch das gleichmäßige chemische Koppeln von Streptavidin oder von Biotin auf dem ganzen Träger) aktiviert wird, dann bei 40 °C gleichmäßig ein bei 10 °C festes (ggf. - wenn hydrophile Moleküle gekoppelt werden sollen - hydrophobes) Farbstoffmolekülen enthaltendes Lösungsmittel auf den Träger aufgebracht wird und man es dort erstarren läßt, worauf dann die an den Träger zu koppelnden Moleküle aufgebracht werden, mittels Laser, Leuchtdioden oder Spannung ausgewählte Bereiche des Trägers erhitzt werden, wodurch sich das Lösungsmittel verflüssigt oder lokal verflüchtigt und das aufgebrachte zu koppelnde Molekül an den Träger binden kann. Die Bindung findet dabei vorzugsweise über Biotin-Streptavidin statt. Anschließend werden ungebundene Moleküle weggewaschen und der Zyklus kann mit einem neuen Spot- oder Druckvorgang beginnen, bis schließlich eine dichtgepackte und komplexe Molekülbibliothek auf den Träger aufgebracht ist.

Das Aufbringen oder die Synthese einer Molekülbibliothek auf einen Träger ist jedoch nicht auf die beschriebenen Verfahren beschränkt; als weitere Verfahren seien beispielhaft erwähnt:

- das Spotten von Mikromengen von Molekülen mit Hilfe eines dem Füllfederhalter vergleichbaren Prinzips, insbesondere von PCR-Produkten vervielfältigter Gensequenzen;
- das Spotten von Mikromengen mit Hilfe einer Art Siebdruckverfahren, insbesondere von aktivierten Monomeren für die Oligonukleotidsynthese, die Synthese von Peptiden oder die Synthese von PNA-s;
- das Spotten von Mikromengen mit Hilfe einer Art Tintenstrahldrucker, insbesondere von aktivierten Monomeren für die Oligonukleotidsynthese, die Synthese von Peptiden oder die Synthese von PNA-s;
- die Synthese von PNA-s, wobei an jeder Stelle der Polymerisationszyklen oder nach dem Aufdrucken der Moleküle auch noch andere Verbindungen angehängt oder die bereits gekoppelten Moleküle modifiziert werden können.

Bei einer zur Lösung der eingangs genannten Aufgabe geeigneten Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen, sind

Mittel, insbesondere ein Laser, zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen auf den Träger und ein Detektor zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen der bestrahlten Moleküle vorgesehen, wobei die Mittel, die zum Einstrahlen der Wellen zur Erzeugung kurzzeitiger elektromagnetischer Wellenimpulse ausgebildet sind, derart mit dem Detektor gekoppelt sind, daß der Detektor während des Einstrahlens eines Wellenimpulses eventuell erzeugte Lumineszenz-Reaktionen nicht erfaßt.

Alternativ oder zusätzlich ist es zur Lösung dieser Aufgabe auch möglich, bei einer Vorrichtung der eingangs genannten Art Mittel zur Bewegung des Trägers relativ zum Detektor und zu den Mitteln zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen derart vorzusehen, daß mit elektromagnetischen Wellen bestrahlte Bereiche des Trägers nach dem Einstrahlen der Wellen aus dem Einstrahlbereich heraus- und in den Erfassungsbereich des Detektors hineinbewegbar sind, wobei der Träger vorzugsweise drehbar gelagert ist.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform gründet dabei auf die Topographie eines Mischarrays von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen mit den darauf aufgebrachten Molekülen mit Leuchtdioden. Die einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden werden dabei in Vertiefungen angeordnet, so daß das von Ihnen abgestrahlte Licht nur bei benachbarten Siliziumerhebungen eine Lumineszenzreaktion anregt. Damit ist wiederholt detektierbar eine exakte, insbesondere kurzzeitige Anregung ausgewählter Bereiche möglich. Diese Ausführungsform bietet sogar die Möglichkeit, eine durch das Lumineszenzsignal entstandene Spannungsänderung direkt

jeder einzelnen Siliziumerhebung zuzuordnen, so daß in diesem Fall der Träger der Moleküle identisch mit dem Detektor ist.

Durch die kurzzeitige Anregung von Fluoreszenzmolekülen kann darüber hinaus auf die gezielte Lumineszenzanregung ausgewählter Bereiche verzichtet werden, wenn die unterschiedlichen Moleküle einer Molekülbibliothek auf ein Array von Detektoren aufgebracht werden. Die Anregung kann in diesem Fall vorzugsweise durch einen gepulsten Laser erfolgen, dessen Licht eine größere Zahl von Detektoren erfaßt. Der in den Dunkelphasen der Anregung aufgrund der Lumineszenz der Moleküle entstehende Strom kann dann parallel in den einzelnen Photodetektoren ausgelesen werden und damit den einzelnen Mitgliedern der Molekülbibliothek zugeordnet werden.

Die räumliche Entkopplung von Anregung und Detektion kann des weiteren im Falle der Anregung durch ein Array von Mikrolasern oder Leuchtdioden sehr einfach durch ein relativ grobes Raster von Detektoren erfolgen, die die in alle Raumrichtungen gestreute Lumineszenz der von dem Anregungslaser angeregten Moleküle erfassen. Dazu muß nur der eine Detektor, der das von dem Anregungslaser eingestrahlte Licht erfaßt, ausgebendet werden. Natürlich kann die zeitliche Entkopplung von Anregung und Detektion auch mit der räumlichen Entkopplung kombiniert werden.

Bei einer anderen Ausführungsform einer Vorrichtung zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, mit Mitteln



zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen auf den Träger und einem Detektor zur Beobachtung der bestrahlten Moleküle sind Mittel zum Ablösen ausgewählter Moleküle vorgesehen, was es insbesondere dann vorteilhaft ermöglicht, Moleküle gezielt von dem Träger abzulösen, wenn diese bei einem ersten Analyseschritt aufgefallen sind. Die abgelösten Moleküle können anschließend einer weiteren Untersuchung, insbesondere einem Detektor zweiter Art, z.B. einem Spektrometer, insbesondere einem Massenspektrometer, zugeleitet werden, mit dem bestimmte Eigenschaften der abgelösten Moleküle erfaßbar sind.

10 Die Mittel zum Ablösen können in vorteilhafter Weiterbildung der genannten Vorrichtung einen Laser umfassen. Besonders einfach und vorteilhaft ist für diesen Zweck jedoch die Verwendung eines elektrisch ansteuerbaren und aufladbaren Trägers, wobei die an den Träger gebundenen Moleküle in ausgewählten Bereichen sehr einfach durch das Anlegen einer Spannung 15 abgelöst werden können.

Als Träger für Moleküle, insbesondere biologische Moleküle, insbesondere zur Verwendung in einem der genannten Verfahren können erfindungsgemäß Träger Verwendung finden, die ein engmaschiges Netz von integrierten Positionsmarkierungen aufweisen, so daß es möglich wird, die Position 20 einer z.B. mittels einer üblichen Mechanik mit einem Detektor auf dem Träger angefahrenen zu untersuchenden Stelle zu kontrollieren. Bevorzugt sind dabei die Positionsmarkierungen so ausgebildet, daß sie von einem optoelektronischen Abtastsystem erfaßbar sind.

Wird als Träger eine im wesentlichen handelsübliche Compact Disc verwendet, so hat dies neben Kostenvorteilen gegenüber den bekannten Diagnostik-Chips den Vorteil, daß zur Untersuchung des Trägers auf im wesentlichen handelsübliche Geräte, insbesondere die in CD-Spielern und 5 CD-Brennern vorgesehen Lese- und Schreiblaser zurückgegriffen werden kann. Wird dann noch die Compact Disc lichtdurchlässig ausgebildet, so kann das Licht des Lasers nicht nur zur optoelektronischen Positions- erfassung, sondern gleichzeitig auch zur Anregung von Lumineszenz- Reaktionen von auf der CD gebundenen Molekülen verwendet werden. Al- 10 ternativ können CDs oder analoge Medien mit einem in die CD integrierten Wellenlängenfilter verwendet werden, wobei ein Laser, dessen Licht den Wellenlängenfilter nicht durchdringen kann, für die ortsgenaue Positio- nierung der CD verwendet wird, während ein zweiter Laser, dessen Licht den Wellenlängenfilter durchdringen kann, aufgrund seines zu dem ersten 15 Laser fixierten Abstandes zur wiederholten ortsgenauen Synthese oder Anregung einer Lumineszenzreaktion verwendet werden kann.

Ähnliche Vorteile werden durch die Verwendung eines Arrays von Mikro- lasern oder Leuchtdioden zur Anregung der Lumineszenz-Reaktion erzielt. Die genaue Positionsinformation ergibt sich in diesem Fall durch die 20 relative Anordnung der Mikrolaser zueinander, so daß nahezu beliebig oft wiederholbar genau definierte Punkte auf einem parallel über dem Array angeordneten vorzugsweise durchsichtigen Träger von Molekülbibliotheken beleuchtet werden können. Der Träger kann dabei aus nahezu beliebigen Materialien bestehen, insbesondere aus für die Synthese einer Molekülbi- 25 bliotheke derivatisiertem Glas.

Insbesondere bei der lithographischen Synthese einer Molekùlbibliothek kann bei der Verwendung eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden der Träger der Molekùlbibliothek besonders vorteilhaft über dem Array fixiert werden. Zusätzlich kann daran auch noch ein Array von Detektoren fixiert werden, was insbesondere eine Kalibrierung der erzielten Einzel-

5 signale mit einem gleichmäßig fluoreszenzmarkierten Träger ermöglicht.

Das gleiche gilt für den weiter oben beschriebenen Mischarray von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen (mit den darauf aufgebrachten Molekùlen) mit Leuchtdioden. Auch solche Mischarrays können an einem Detektor oder einem Array von Detektoren fixiert werden, wenn nicht sogar die durch ein Lumineszenzsignal entstandene Spannungsänderung direkt jeder einzelnen Siliziumerhebung zugeordnet wird, so daß in diesem Fall der Träger der Molekùle identisch mit dem Detektor ist. Dies gewährleistet eine sehr einfache und dennoch extrem genaue, wiederholbare Ansteuerung der einzelnen Bildpunkte während der lithographischen oder durch das Anlegen einer Spannung gesteuerten Synthese der Molekùlbibliothek und den sich daran anschließenden Färbe- und Ausleseschritten, darüber hinaus entfällt das zeitaufwendige Ansteuern und Fokussieren der einzelnen Bildpunkte. Aufgrund des Fehlens jeglicher bewegter Teile ist eine solche

10 Ausführungsform besonders robust und einfach in der Handhabung.

15

20

Auf einem solchen Träger können hochkomplexe Molekùlbibliotheken, z.B. eine Peptidbibliothek, insbesondere eine vorzugsweise vollständige 4-, 5-, 6- oder 7mer Peptidbibliothek, oder eine Oligonukleotidbibliothek, insbesondere eine vorzugsweise vollständige 12-, 13-, 14- oder 15mer Oligonuk-

leotidbibliothek oder Aptamerbibliothek, so aufgebracht werden, daß die Position der einzelnen Moleküle bzw. Molekülgruppen aus mehreren Molekülen einer Molekülart wiederholt exakt anfahrbar und damit gezielt untersuchbar ist.

- 5 Zum Aufbringen von Molekülen auf eine im wesentlichen ebene Oberfläche eines Trägers wird erfindungsgemäß zum einen eine Vorrichtung vorgeschlagen, die Mittel zur drehbaren Halterung des Trägers um eine zu der genannten Oberfläche des Trägers im wesentlichen senkrechte Drehachse, Mittel zum Aufbringen verschiedener Flüssigkeiten auf die Oberfläche des
10 Trägers im Bereich der Drehachse und wenigstens einen relativ zum Träger verfahrbaren Laser zum Bestrahlen ausgewählter Bereiche des Trägers mit Laserlicht umfaßt.

Bei der Verwendung eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden wird in den Lichtstrahl der Lichtquellen ein geeigneter vorzugsweise durchsichtiger Träger gebracht und dort fixiert. Die genaue Positionsinformation ergibt sich in diesem Fall durch die relative Anordnung der Mikrolaser bzw. Leuchtdioden zueinander, so daß genau definierte Punkte auf dem Träger wiederholt beleuchtet werden können. Dies kann insbesondere für die lithographische Synthese und das anschließende Auslesen von Molekül-
20 bibliotheken ausgenutzt werden.

Wenn die Molekùlbibliotheken unabhängig von der Aktivität des bzw. der Anregungslaser auf den Träger aufgebracht werden, so dienen in Bezug zu der aufgebrachten Molekùlbibliothek regelmäßig angeordnete, in geeigne-

ter Weise detektierbare "guide dots" als Bezugspunkt zur Positionsbestimmung der aufgebrachten unterschiedlichen Moleküle.

Alternativ kann dazu auch eine Vorrichtung dienen, bei der düsenartige Mittel zum Aufbringen kleinster Mengen auf dem Träger zu verankernder Moleküle, Mittel zum Verfahren der Mittel zum Aufbringen der Moleküle und des Trägers relativ zueinander und wenigstens ein Laser zur Be- strahlung ausgewählter Bereiche des Trägers mit Laserlicht vorgesehen sind.

Alternativ können Moleküle oder Molekülbibliotheken auch mit verschiedenen bereits bekannten Druckverfahren auf den verwendeten Träger aufgebracht werden, z.B. mit einem modifizierten Siebdruckverfahren. PCR-Fragmente werden beispielsweise momentan nach dem Prinzip des Füllfederhalters aufgedruckt. Letzteres erlaubt zwar die Synthese hochkomplexer Molekülbibliotheken, jedoch müssen bei Druckverfahren die einzelnen Spots an den Auslesemechanismus angepaßt werden, was sehr zeitaufwendig ist, da jeder Spot angefahren und in der Regel durchfokussiert werden muß, bis schließlich die Einstellung gewählt wird, die die maximale Lichtausbeute gibt, was sich bei Verwendung einer CD oder eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden erübrigt, da insbesondere bei einem Array von Mikrolasern die einzelnen Bildpunkte mit nahezu parallelem Licht durchstrahlt werden. Gleiches gilt, wenn ein Array von Detektoren als Träger der Moleküle verwendet wird.

Auch bei einer CD oder analogen Trägern ist das genannte Problem aufgrund des extrem engmaschigen Netzes von Positionsinformationen sehr gemildert, da sich immer in nächster Nähe ein Pit findet, relativ zu dem die Moleküle auf dem Träger verankert und ausgelesen werden können.

- 5 Insbesondere wenn als Träger der Moleküle ein weiter oben beschriebener Array von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen oder ein Mischarray mit Leuchtdioden verwendet wird, können aufgedruckte Moleküle auch aufgrund einer in ausgewählten Bereichen angelegten Spannung auf den Träger aufgebracht werden, wenn die aufzubringenden Moleküle eine entsprechende Ladung tragen oder mit Hilfe der gezielt ansteuerbaren Lichtquellen in ausgewählten Bereichen ionisiert wurden.
- 10

Die Erfindung erlaubt es dem Fachmann also vorteilhaft, die zur Aufbringung der jeweiligen Moleküle auf die jeweiligen Träger optimal geeignete Vorrichtung zu wählen, wobei er im Einzelfall auch beide Vorrichtungen kombinieren und zunächst einen Teil der Moleküle mit der einen und dann einen anderen Teil der Moleküle mit der anderen Vorrichtung auf den Träger aufbringen kann.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der rein beispielhaften und nicht beschränkenden Beschreibung einiger Ausführungs-
20 bzw. Durchführungsbeispiele in Verbindung mit der Zeichnung.

In Fig. 1 ist das Funktionsprinzip einer Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf der Oberseite 10 eines Trägers 12 gebun-

denen biologischen Molekülen 14 veranschaulicht, wobei der Träger 12 um eine zur Oberseite 10 senkrechte Achse 16 rotiert, wie durch den Pfeil 18 angedeutet. Dabei handelt es sich bei dem Träger 12 um eine im wesentlichen handelsübliche CD, die jedoch lichtdurchlässig ausgebildet ist und die auf ihrer der Oberseite 10 gegenüberliegenden Seite mit Vertiefungen, sog. "Pits" versehen ist, die durch die Striche 20 angedeutet sind und die sich unter einer transparenten Schutzschicht befinden.

Die Pits bilden interne Positionsmarkierungen, die von dem hier nur angedeuteten optoelektronischen Erfassungssystem eines üblichen CD-Spielers oder CD-Brenners gelesen werden können. Das Erfassungssystem besteht dabei bekannterweise im wesentlichen aus einem hier nicht gezeigten Laser und einer - wie durch den Bewegungspfeil 22 angedeutet - verstell- oder verfahrbaren Fokussierspule oder -linse 24, welche es erlaubt, die von dem Laser erzeugten Strahlen 26 vorteilhaft sowohl zum Abtasten der Pits 20 und damit zur Positionsbestimmung als auch - wie in dem in der Figur gezeigten Zeitpunkt - durch die CD hindurch zur Bestrahlung und eventuellen Anregung der Moleküle 14 zu verwenden.

Dem Ort der Bestrahlung ist in Bewegungsrichtung der CD ein lichtempfindlicher Detektor 28 nachgeordnet, dem eine Linse 30 zugeordnet ist, die von eventuell angeregten Molekülen emittierte Lichtstrahlen 32 bündelt und auf den Detektor 28 lenkt. Durch diese Anordnung ist sichergestellt, daß das Licht des Lasers nicht den Detektionsvorgang durch Überlagerung stört. Zudem können so Lumineszenz-Reaktionen angeregter Moleküle erfaßt werden, während gleichzeitig bereits neue Moleküle bestrahlt werden,

so daß die Untersuchung der auf der CD angeordneten Moleküle vorteilhaft mit sehr hoher Geschwindigkeit durchgeführt werden kann.

In Fig. 2 ist die Verwendung eines Arrays 40 von Mikrolasern 42, 44 zur Anregung von auf einer Flachseite 46 eines Trägers 48 gebundenen Molekülen 50, 52 dargestellt. Da die Mikrolaser einzeln ansteuerbar und relativ zueinander in festgelegter Position angeordnet sind, können genau definierte Punkte auf dem parallel über dem Array 40 befestigten im gezeigten Beispiel durchsichtigen Träger 48 beleuchtet und dort befindliche Moleküle ggf. zur Lumineszenz angeregt werden. So sind zum dargestellten Zeitpunkt die Mikrolaser 42 inaktiv, während der Mikrolaser 44 aktiv ist und Licht auf die Molekülgruppe 50 einstrahlt. Es sei an dieser Stelle betont, daß der Träger 48 zwar bei diesem Ausführungsbeispiel durchsichtig ist, daß der Träger aber nicht notwendigerweise durchsichtig sein muß, denn anregende Lichtquelle und Detektor können auch auf ein und derselben Seite des Trägers angeordnet werden, nämlich auf der Seite, auf der sich die zu untersuchenden Moleküle befinden.

Zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen ist bei diesem Ausführungsbeispiel ein Array 54 aus einer Anzahl von Detektoren 56, 58 vorgesehen. Dies erlaubt eine besonders einfache Trennung von Anregung und Detektion dadurch, daß der oder die im direkten Strahlengang eines aktiven, also eine Anregung der Moleküle bewirkenden Lasers 44 befindlichen Detektoren 58 zumindest während des Emissionszustands des Lasers "ausgeschaltet" werden, z.B. in der Weise, daß evtl. auf den Detektor oder die Detektoren einfallende Strahlung nicht weiter erfaßt oder Signale von den

jeweiligen Detektoren nicht weitergeleitet oder ausgewertet werden. Die anderen Detektoren 56 können, vorzugsweise bei gepulster Einstrahlung, ebenfalls für die Dauer der Anregungsphase ausgeschaltet werden, was aber nicht zwingend notwendig ist. Insbesondere ist es möglich, zwischen dem Array 54 von Detektoren und dem Träger 48 einen Wellenlängenfilter 60 anzuordnen, der Strahlung 62 mit der Wellenlänge der Anregungslaser ausfiltert oder zumindest stark abschwächt (wie durch die Strahlen 62' angedeutet), Lumineszenz-Strahlung 64 dagegen passieren läßt, so daß diese von den aktiven Detektoren 56 erfaßt und in entsprechende Signale umgewandelt werden kann, welche dann an eine an sich bekannte und daher hier nicht weiter beschriebene Signalauswertungseinrichtung, z.B. einen Computer, weitergeleitet werden können.

Ein in Fig. 2 gezeigter Träger kann z.B. dann, wenn für die Synthese und das Auslesen einer hochkomplexen Molekülbibliothek eine sehr genaue Auflösung der einzelnen Bildpunkte auf dem Träger benötigt wird, bereits vor einer z.B. lithographischen Synthese einer Molekülbibliothek fest (aber nicht unlösbar) mit dem Array von Mikrolasern verbunden werden und dies während der Synthese und Färbung mit einer zweiten Substanz (beispielsweise dem Blutserum von Patienten) bis zum Auslesen der Lumineszenzreaktion auch bleiben. Anschließend kann der Träger entsorgt und ein neuer Träger fest mit dem Array von Mikrolasern verbunden werden. Zusätzlich kann auch ein Array von Detektoren fest mit dem Array von Mikrolasern verbunden werden, wie in Fig. 10 dargestellt.

Alternativ können auf dem Träger sogenannte "guide dots" in regelmäßigen Abständen eingefügt werden, die jeweils ein definiertes Lumineszenz-Signal ergeben und damit die Funktion der Pits auf der CD übernehmen, d.h. ein internes Raster abgeben, das zur Positionsinformation dient.

- 5 Das Entkoppeln von Anregung und Detektion ist bei diesen Beispielen noch einfacher als bei dem Beispiel mit Verwendung einer CD als Träger, da ein Mikrolaser nach dem anderen aktiviert werden kann. Beispielsweise kann man ein größeres Raster von Photodioden über dem Array aufbauen, wobei jeweils die Diode im Intensitätsmaximum des gerade aktiven Anregungs-
10 lasers ausgeschaltet ist.

Ist die Leistung des bzw. der Laser steuerbar, so kann/können der/die Laser auch zum Ablösen ausgewählter Moleküle von dem Träger verwendet werden, wobei die abgelösten Moleküle dann in geeigneter Weise einer weiteren Untersuchungseinrichtung, z.B. einem Massenspektrometer, zugeführt werden können.

- In der Fig. 8 ist noch einmal beispielhaft das Grundprinzip des vorgestellten Untersuchungsverfahrens dargestellt: ausgewählte Bereiche 7 eines Trägers 12 mit daran gekoppelten Molekülen oder Aggregaten 4 an diese Moleküle oder mit Molekülen 8, die mit den gekoppelten Molekülen 2 oder
20 mit den Aggregaten an diese Moleküle 4 in Wechselwirkung treten, werden mit elektromagnetischen Wellen 6 bestrahlt.

In den Fig. 9 und 10 ist schematisch gezeigt, wie die physikalische Umgebung, insbesondere die Matrixschicht 3 von Substanzen 5 in lokal eng begrenzten Bereichen 7 durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen 13 (Fig. 9) oder durch das Anlegen einer Spannung 13' (Fig. 10) verändert werden kann, so daß die vorher immobilisierten Substanzen 9 beweglich gemacht werden (bewegliche Substanzen sind durch 11 angedeutet) und in die Nähe des Trägers 12 gelangen können. Dort können sie an auf dem Träger befindliche Moleküle 2 ankoppeln (Bindungen eingehen), ein Aggregat bilden oder Teil einer sonstigen chemischen Reaktion werden. In Fig. 10 ist zudem gezeigt, daß der Träger 12 in ein Mischarray 17 aus Detektoren 56 und aus gezielt ansteuerbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, z.B. Leuchtdioden 19, eingebettet sein kann. Ausgewählte Bereiche 7 des Trägers 12 werden dabei zweckmäßigerweise durch einen nicht-leitenden und auch für die eingestrahlten elektromagnetischen Wellen undurchlässigen Isolator 21 voneinander getrennt.

Wie in Fig. 11 veranschaulicht, können mit einem Array von einzeln ansteuerbaren Mikrolasern ausgewählte Bereiche eines über dem Array fixierten Trägers wiederholt punktgenau bestrahlt werden. Dadurch können Moleküle einer Molekülbibliothek mit lithographischen Methoden auf ausgewählte Bereiche des Trägers aufgebracht werden. Nach der Einfärbung der Molekülbibliothek mit einem Fluoreszenzfarbstoff werden die fluoreszierenden Moleküle in nacheinander ausgewählten Bereichen mit einem kurzzeitigen Lichtimpuls angeregt. Die zwischen den Anregungs-impulsen durch die Fluoreszenz der Moleküle erzeugte Strahlung wird von den Photodetektoren aufgefangen und kann einzelnen Mitgliedern der

Molekülbibliothek zugeordnet werden, so daß genau ermittelt werden kann, bei welchen Molekülen Fluoreszenzreaktion hervorgerufen wurden.

Bei einem entsprechend ausgebildeten Mischarray 17 aus einzeln ansteuerbaren Lichtquellen 19 und Detektoren 56 können - wie in Fig. 12 gezeigt - die Detektoren 56 selbst Träger 12 von unterschiedlichen Molekülen 2, 4 und 8 sein. Ein solches Mischarray 17 kann z.B. dazu verwendet werden werden, in ausgewählten Bereichen 7 eine kombinatorische Molekülsynthese auszulösen, ausgewählte Bereiche 7 kurzzeitig mit elektromagnetischen Wellen 6 anzuregen und die bei einer solchen Anregung eventuell entstehenden Lumineszentreaktionen direkt zu messen. Als Detektoren 56 können dabei insbesondere Siliziumträger, Leuchtdioden oder ein davon unabhängiger Array aus Detektoren verwendet werden. Zur Trennung der Bereiche 7 voneinander ist ein nichtleitender, für die eingestrahlten elektromagnetischen Wellen undurchlässiger Isolator 21 vorgesehen.

In den Fig. 13 und 14 ist schematisch gezeigt, wie ein Array 23 aus einzeln ansteuerbaren Detektoren 27 (Fig. 13), die Träger 12 von unterschiedlichen Molekülen 2,4 und 8 sein können, bzw. ein Array aus einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden 29 (Fig. 14), die auch als Photodetektoren verwendet werden können, dazu verwendet werden kann, in ausgewählten Bereichen 7 eine kombinatorische Molekülsynthese auszulösen, größere Bereiche 25 oder ausgewählte Bereiche 7 kurzzeitig mit elektromagnetischen Wellen 6 anzuregen und die bei einer solchen Anregung eventuell entstehenden Lumineszentreaktionen in den Dunkelphasen der Anregung direkt zu messen. Als Detektoren 27 können dabei

insbesondere Siliziumträger verwendet werden (Fig. 13). Zur Trennung der Bereiche 7 voneinander ist wiederum ein nichtleitender, für die eingestrahlten elektromagnetischen Wellen undurchlässiger Isolator 21 vorgesehen.

Nachfolgend sind einige Beispiele der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren bzw. der Anwendung erfindungsgemäßer Vorrichtungen beschrieben:

- a) Synthese einer vollständigen 6mer Peptidbibliothek auf einer CD unter wasserfreien Bedingungen

Die Oberfläche einer CD wird mit einer Kunststoffschicht überzogen, die freie Aminogruppen für die Festphasensynthese enthält. Nach der Kopplung eines geeigneten Spacers von 2-3 Aminosäuren Länge mit Hilfe von Standard fMoc-Peptidsynthese, werden freie Aminosäuren anschließend mit einer durch Licht abspaltbaren Schutzgruppe abgeblockt. Die Zuleitung der zu koppelnden Schutzgruppe erfolgt durch einen Schlauch auf das Innere der sich drehenden CD. Dabei kann ein leicht modifiziertes Syntheseprogramm eines an sich bekannten Peptidsynthesizers verwendet werden. Ein Programm, das die Aktivität eines Brennlasers steuert, spaltet die Schutzgruppen an den Bereichen ab, wo im ersten Schritt die Aminosäure Alanin gekoppelt werden soll. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt durch Zwei-Photonen-Aktivierung mit Hilfe des Brennlasers und eines von oben einstrahlenden, etwas weniger fokussierten zweiten Lasers. Nach der selektiven Abspaltung der Schutzgruppe wird die aktivierte Aminosäure

Alanin durch den oben erwähnten Schlauch der CD zugeführt. Die aktivierte Aminosäure koppelt an die freien Aminogruppen, wobei die eigene Aminogruppe der Aminosäure zuvor durch die gleiche Schutzgruppe wie oben erwähnt blockiert worden ist. Dieser Vorgang wird für die anderen 5 19 Aminosäuren wiederholt und das Ganze insgesamt sechs Mal wiederholt. Im letzten Schritt werden die Schutzgruppen von allen synthetisierten Peptiden abgespalten.

b) Synthese einer vollständigen 5mer Peptidbibliothek mit Hilfe eines Arrays von Mikrolasern

10 Ein geeigneter flacher, durchsichtiger Träger, der freie Aminogruppen enthält wird fest über dem Array von Mikrolasern fixiert. Geeignet sind dabei insbesondere dünne Glasscheiben, die mit konz. NaOH gereinigt, anschließend mit Wasser gewaschen und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 10% (vol/vol) bis(2-hydroxyethyl) aminopropyltriethoxysilan derivatisiert wurden. Alternativ kann ein geeigneter flacher, durchsichtiger Träger mit 15 einer Kunststoffschicht überzogen werden, die freie Aminogruppen für die Festphasensynthese enthält.

An die freien Aminogruppen wird mithilfe von dem Fachmann geläufiger Standard fMoc-Peptidsynthese unter wasserfreien Bedingungen zunächst ein 20 geeigneter Spacer von 2-3 Aminosäuren Länge synthetisiert.

Anschließend wird der Träger parallel zur X-Achse in 20 voneinander getrennte Bereiche unterteilt, die von den 20 verschiedenen jeweils in DMF gelösten aktivierten fMoc-Derivaten der Aminosäuren benetzt werden.

Die Kopplung der aktivierten Aminosäuren findet anschließend bei Raumtemperatur für 30-60 Minuten statt. Nach 3 maligem Waschen mit Dimethylformamid (DMF) wird die fMoc-Schutzgruppe mithilfe von 20% Piperidin in DMF abgespalten und erneut mit DMF gewaschen.

Der Träger wird erneut in 20 voneinander getrennte Bereiche unterteilt, diesmal parallel zur Y-Achse. Diese Bereiche werden wiederum von den 20 verschiedenen jeweils in DMF gelösten aktivierten fMoc-Derivaten der Aminosäuren benetzt gefolgt von der oben beschriebenen dem Fachmann geläufigen Standard fMoc-Peptidsynthese.

Nach der wie oben beschriebenen Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe ist in diesem Stadium der oben beschriebene Träger in 400 voneinander abgegrenzte Bereiche unterteilt, mit jeweils einem von 400 möglichen C-terminal durch einen Spacer an den Träger gekoppelten Dipeptiden deren N-Terminus frei, d.h. ohne Schutzgruppe vorliegt.

Für die nächsten Kopplungsschritte werden die oben beschriebenen aktivierte Aminosäuren einzeln statt in DMF in einem geeigneten bei 50 °C flüssigen, bei 4 °C festen Lösungsmittel gelöst, ein geeigneter das Laserlicht absorbierender und in Bezug auf die aktivierte Aminosäuren

inerter Zusatzstoff, insbesondere ein Farbstoff oder Graphitpartikel, zugegeben, die Lösung tiefgefroren und in kleine Partikel zerrieben.

Diese Partikel werden bei 4 - 10 °C auf den über einem Array von Mikrolasern fest montierten Träger gestäubt, eine Abdeckplatte darübergelegt und ausgewählte Bereiche für 20-30 Minuten mit den Mikrolasern bestrahlt. Die Absorption des Laserlichts durch den beigemengten Farbstoff erwärmt dabei lokal in den bestrahlten Bereichen das bei den gewählten Temperaturen gefrorene Lösungsmittel und ermöglicht damit die Kopplung der aktivierten Aminosäuren an die freien Aminogruppen ausschließlich in diesen Bereichen. Anschließend wird die Abdeckplatte entfernt, und die nicht gekoppelten Aminosäuren werden mit DMF weggeschwemmt, wobei dieser Waschvorgang mit erwärmtem DMF 2x wiederholt wird.

Dieser Vorgang wird insgesamt 20x mit allen aktivierten Aminosäuren wiederholt, sodaß die oben beschriebenen 400 voneinander abgegrenzten Bereiche in 20×400 definierte Bereiche unterteilt werden, gefolgt von der oben beschriebenen Abspaltung der fMoc-Schutzgruppen mit 20% Piperidin in DMF.

Die Verlängerung der Peptide um eine 4. und 5. Aminosäure erfolgt anschließend analog zur Synthese der 3. Aminosäure, wobei wie oben beschrieben bei jedem Syntheseschritt jeder Bereich in 20 Bereiche unterteilt wird.

Schließlich werden alle Schutzgruppen mit 10% Silan in konzentrierter Trifluoressigsäure abgespalten, der Träger mit DMF und Methanol gewaschen und getrocknet, sodaß im Endeffekt ein Träger mit $20^5 = 3.200.000$ verschiedenen Bereichen entsteht, die jeweils eines von allen möglichen C-terminal gekoppelten Pentapeptiden repräsentieren.

- 5
- c) Untersuchung von Blutserum unter Verwendung einer Compact Disc mit einer darauf fixierten Peptidbibliothek

Die CD wird mit dem Blutserum eines Patienten gefärbt, wozu zunächst unspezifische Bindungen mit einer geeigneten wäßrigen Lösung, wie zum Beispiel 2 % Milchpulver in PBS abgeblockt werden und das Blutserum im gleichen Puffer verdünnt wird, worauf dann die Oberfläche der CD unter leichtem Schütteln für 60 Minuten mit dem Serum benetzt wird. Die CD wird drei Mal gewaschen. Der an den Farbstoff Cy5 gekoppelte Ziegen-Anti-Mensch-Antikörper wird in 2 % Milchpulver in PBS verdünnt; anschließend wird damit die Oberfläche der CD unter leichtem Schütteln für 60 Minuten benetzt und sodann drei Mal gewaschen. Die mit dem zweiten Antikörper gefärbte Compact Disc wird in einem abgewandelten CD-Spieler ausgelesen.

- 10
- 15
- 20
- d) Auslesen einer gefärbten Compact Disc mittels eines umgebauten CD-Brenners

Ein auf schwache Wattstärke eingestellter Brennlaser rastert die CD im ersten Durchlauf ab. Dabei werden eventuelle Fluoreszenzsignale mit Hilfe der in den CD-Brenner zusätzlich eingebauten Optik detektiert und den einzelnen CD-Bereichen zugeordnet. Diese zusätzliche Optik besteht aus einer fokussierenden Linse, die einen oder, wenn gewünscht, mehrere Pits auf einen Photomultiplier oder eine CCD-Kamera abbildet. Die Linse bildet dabei einen Punkt in Laufrichtung der CD außerhalb des Maximums des einstrahlenden Lasers ab. Zusätzlich wird das Laserstreulicht durch einen geeigneten Kantenfilter von dem Fluoreszenzsignal abgetrennt. Die Bereiche der CD, die im ersten Durchlauf ein Signal ergaben, werden in den folgenden Durchgängen gezielt angesteuert und mehrfach abgerastert. Die dabei abgelesenen Signale werden aufaddiert und den positiven Pits zugeordnet.

e) Untersuchung von Blutserum unter Verwendung eines Trägers mit darauf fixierter Peptidbibliothek

Wie bei Beispiel c) beschrieben wird der in diesem Beispiel fest auf einem Array von Mikrolasern montierte Träger mit einer in Beispiel b) beschriebenen lithographisch synthetisierten vollständigen Pentapeptid-Bibliothek mit einer geeigneten wässrigen Lösung, vorzugsweise 2% Milchpulver in PBS, abgeblockt, mit dem verdünnten Blutserum von Patienten inkubiert und anschließend mit einem Cy5 gekoppelten Ziege-anti-Mensch-Antikörper gefärbt.

Anschließend wird sequentiell jeweils ein Mikrolaser nach dem anderen angeschaltet und das von evtl. gebundenen Fluoreszenzmolekülen emitierte Licht mithilfe eines größeren Rasters von Photodioden über dem Array von Mikrolasern ausgelesen, wobei jeweils die Diode im Intensitätsmaximum des gerade aktiven Anregungslasers ausgeschaltet ist (vgl. Fig. 2). Das von dem Anregungslaser verursachte Streulicht wird zusätzlich durch einen geeigneten Wellenlängenfilter von dem Fluoreszenzlicht abgetrennt.

Um das Signal / Rausch Verhältnis noch weiter zu verbessern, kann der einstrahlende Mikrolaser gepulst werden, wobei die Detektion des Fluoreszenzsignals in den Dunkelphasen des einstrahlenden Lasers erfolgt.

Die Fluoreszenzsignale werden in insgesamt 10 unterschiedliche Helligkeitsstufen unterteilt, die den einzelnen Mikrolasern (d.h. in diesem Fall den unterschiedlichen Pentapeptiden) zugeordnet werden.

Die Mikrolaser, die in einem ersten Durchlauf die höchsten Fluoreszenzsignale ergaben können anschließend mehrfach hintereinander zur Anregung verwendet werden, wonach die dabei erhaltenen Fluoreszenzsignale gemittelt werden.

f) Synthese einer vollständigen 12mer Oligonukleotidbibliothek auf einem Träger mit Hilfe eines Arrays von Mikrolasern

Wie in Beispiel b) für die Synthese einer vollständigen 5mer Peptidbibliothek beschrieben, wird ein geeigneter flacher durchsichtiger Träger mit freien Aminogruppen verwendet.

Falls nicht schon durch den ersten Schritt vorhanden, wird an die freien Aminogruppen mithilfe von dem Fachmann geläufiger Standardsynthese unter wasserfreien Bedingungen ein geeigneter Linker synthetisiert, der wiederum freie Aminogruppen auf dem Träger verankert, die diesmal jedoch ca 22 Atome von der Oberfläche entfernt sind.

Anschließend wird der Träger parallel zur X-Achse in 4 voneinander getrennte Bereiche unterteilt, die von 4 verschiedenen aktivierten Nucleosidanhydraten mit Schutzgruppen benetzt werden. Die Nucleoside koppeln anschließend an die freien Aminogruppen (Fig. 3). Anstelle des im basischen abspaltbaren Linkers kann auch ein unter diesen Bedingungen stabiler Linker verwendet werden.

Die Kopplung der aktivierten Nucleoside (mit Schutzgruppen) an den festen Träger, das Abspalten der Schutzgruppen und die Waschschritte finden unter den dem Fachmann bekannten Standardbedingungen für die Oligonukleotidsynthese statt. Beispiele für die dabei verwendeten Schutzgruppen sind:

- DMTr für das 5'-Ende der Nucleoside (Fig. 3)
- Benzoyl im Falle der Basen Adenin und Cytosin (Fig. 4)
- Isobutyryl im Falle der Base Guanin (Fig. 4)

- Methoxy - oder Beta-cyanoethyl - im Falle der Phosphatgruppen (Fig. 4)

Nach der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe von dem 5'-Ende der Nucleoside wird im nächsten Schritt der Träger erneut in 4 voneinander getrennte Bereiche unterteilt, die diesmal parallel zur Y-Achse verlaufen. Diese Bereiche werden diesmal von den 4 verschiedenen, mit Hilfe einer schwachen Säure wie Tetrazol aktivierten Phosphoramidit-Derivaten benetzt. Durch die Kopplung der aktivierte Phosphoramidite an das freie 5'-OH-Ende findet eine Kettenverlängerung um eine Base statt (Fig. 5).

- 10 Im nächsten Schritt werden evtl. verbliebene freie 5'-OH-Enden mit einem "Cap" versehen, sodaß sie an späteren Reaktionen nicht mehr teilnehmen können (Fig. 6).

Ein letzter Schritt, in dem trivale Phosphatgruppen oxidiert werden beschließt den Synthesezyklus (Fig. 7).

- 15 Die oben beschriebene Synthese entspricht dem dem Fachmann geläufigen Standard der Oligonukleotidsynthese. Im Unterschied zu der geläufigen Standardsynthese werden allerdings die Oligonukleotide derart auf dem festen Träger verankert, daß sie nach der abschließenden vollständigen Abspaltung der Schutzgruppen nicht von dem Träger abgespalten werden, 20 sondern an den Träger gekoppelt verbleiben.

Anschließend wird die DMTr-Schutzgruppe wiederum mithilfe von TCA vom 5'-OH Ende abgespalten, sodaß sich auf dem oben beschriebenen Träger in diesem Stadium 16 unterteilte voneinander abgegrenzte Bereiche befinden, mit jeweils einem von 16 möglichen über das 3'-Ende durch einen Spacer an den Träger gekoppelten Dinukleotiden deren 5'-Ende eine freie OH-Gruppe trägt.

Für die nächsten Kopplungsschritte werden die oben beschriebenen aktivierte Phosphoramidit-Derivate einzeln statt in Acetonitril in einem geeigneten bei 50 °C flüssigen, bei 4 °C festen Lösungsmittel gelöst, ein geeigneter das Laserlicht absorbierender und in Bezug auf die aktivierte Nukleoside inerter Farbstoff, insbesondere Graphitpartikel, zugegeben, die Lösung tiefgefroren und in kleine Partikel zerrieben.

Diese Partikel werden bei 4 - 10 °C auf den über einem Array von Mikrolasern fest montierten Träger gestäubt, eine Abdeckplatte darüber gelegt und ausgewählte Bereiche für 20-30 Minuten mit den Mikrolasern bestrahlt. Die Absorption des Laserlichts durch den beigemengten Farbstoff erwärmt dabei lokal in den bestrahlten Bereichen das bei den gewählten Temperaturen gefrorene Lösungsmittel und ermöglicht damit die Kopplung der aktivierten Phosphoramidit-Derivate an die freien 5'-OH-Enden ausschließlich in diesen Bereichen. Anschließend wird die Abdeckplatte entfernt, und die nicht gekoppelten Phosphoramidit-Derivate werden mit kaltem Acetonitril weggeschüttet. Anschließend wird dieser Waschvorgang mit erwärmtem Acetonitril 2x wiederholt.

Dieser Vorgang wird insgesamt 4x mit allen aktivierten Phosphoramidit-Derivaten wiederholt, sodaß die oben beschriebenen 16 voneinander abgegrenzten Bereiche in 4×16 definierte Bereiche unterteilt werden, gefolgt von dem oben beschriebenen "Capping" verbliebener freier 5'-OH-Enden, der Oxidation der trivalenten Phosphatgruppen und einer erneuten Abspaltung der DMTrSchutzgruppen mit TCA.

- 5
- Die Verlängerung der Oligonukleotide um weitere 9 Basen erfolgt anschließend analog zur Synthese der 3. Base, wobei wie oben beschrieben bei jedem Syntheseschritt jeder Bereich in 4 definierte Bereiche unterteilt wird.
- 10 Schließlich werden alle Schutzgruppen mit Dichlormethan und Trichlortessigsäure abgespalten, der Träger mit Acetonitril gewaschen und getrocknet, sodaß im Endeffekt ein Träger mit $4^{12} = 16.777.216$ verschiedenen Bereichen entsteht, die jeweils eines von allen möglichen über das 3'-Ende gekoppelten 12mer Oligonukleotiden repräsentieren.
- 15 g) Untersuchung von Patienten-DNA unter Verwendung eines Arrays von Mikrolasern mit einer auf einem Träger fixierten 12mer Oligonukleotidbibliothek

- Der unter Beispiel f) beschriebene Träger mit einer darauf fixierten vollständigen Oligonukleotid-Bibliothek wird mit Patienten-DNA gefärbt.
- 20 Unspezifische Bindungen werden z.B. mit DNA aus Heringsspermien abgesättigt.

Dem Patienten wird eine Tumor-Gewebsprobe und gleichzeitig eine Probe mit gesundem Gewebe entnommen und die darin enthaltene genomische DNA mithilfe eines oder mehrerer Paare von Tumorgen-spezifischen Primern (spezifisch z.B. für die Gene von p53, p16, ras, c-myc, n-myc) 5 in einer Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Dabei werden FITC-markierte dNTPs in die Tumorprobe eingebaut, bzw. die Normalprobe mit biotinylierten dNTPs markiert, die Proben gemischt und auf den Träger hybridisiert. Anschließend wird die hybridisierte Probe nachgefärbt mit einem chemisch gekoppelten Protein aus Streptavidin und Phycoerythrin an 10 das zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt wurde. Dadurch kann mit einer Anregungswellenlänge 2 verschiedene Fluoreszenzen gemessen werden.

Wie in Beispiel e) beschrieben, wird anschließend sequentiell jeweils ein Mikrolaser nach dem anderen angeschaltet und das von evtl. gebundenen 15 Fluoreszenzmolekülen emitierte Licht mithilfe eines größeren Rasters von Photodioden über dem Array von Mikrolasern ausgelesen, wobei jeweils die Diode im Intensitätsmaximum des gerade aktiven Anregungslasers ausgeschaltet ist. Das von dem Anregungslaser verursachte Streulicht wird zusätzlich durch einen geeigneten Wellenlängenfilter von dem Fluoreszenzlicht abgetrennt. Der Wellenlängenfilter wird dabei einmal auf den Fluoreszenzfarbstoff FITC und zum anderen auf den Tandemfarbstoff Phycerythrin-Cy5 (PE-Cy5) abgestimmt. 20

Die Fluoreszenzsignale werden dann jeweils in insgesamt 10 unterschiedliche Helligkeitsstufen unterteilt, die den einzelnen Mikrolasern (d.h. in diesem Fall den unterschiedlichen Oligonukleotiden) zugeordnet werden.

Die Mikrolaser, die in einem ersten Durchlauf ein von den anderen Bildpunkten auffällig unterschiedliches Verhältnis der FITC-Färbung zur PE-Cy5-Färbung ergaben, werden anschließend mehrfach hintereinander zur Anregung verwendet, wonach die dabei erhaltenen Fluoreszenzsignale aufsummiert werden und erneut das Verhältnis der FITC-Färbung zur PE-Cy5-Färbung bestimmt wird.

10 Auf diese Weise können Punktmutationen in Genen, die für die Prognose von Tumorerkrankungen wichtig sind, diagnostiziert werden. Im Unterschied zu den auf dem Markt befindlichen Systemen können mit einer vollständigen 12mer Oligonukleotidbibliothek viele Gene gleichzeitig analysiert werden.

15 In einem alternativen Ansatz dient die dem Patienten entnommene DNA als Template für die Vervielfältigung mit sogenannten Alu-Primern, die an die Ränder von sehr häufig im Genom vorkommenden repetitiven Alu-Sequenzen hybridisieren und die zwischen 2 Alusequenzen liegende nicht-repetitive DNA vervielfältigen. Wieder werden FITC-markierte dNTPs in die Tumorprobe bzw. biotinylierte dNTPs in die Normalprobe eingebaut, die Proben gemischt auf den Träger hybridisiert.

Das Auslesen der Fluoreszenzsignale erfolgt anschließend wie oben beschrieben. Auf diese Weise wird das gesamte Genom auf Unterschiede zwischen normalem und Tumorgewebe abgerastert, wodurch neue diagnostische Marker entdeckt werden können, die wichtige Informationen für die 5 Tumorprogression liefern.

- h) Kombination des Fluoreszenzdetektors gemäß Beispiel d) mit einem Massenspektrometer

Der Fluoreszenzdetektor gemäß Beispiel d) bzw. nur der CD-Brennerteil ohne zusätzliche Fluoreszenz-Optik wird mit einem evakuierbaren Gefäß 10 umhüllt. An der Stelle des normalen Probenhalters eines Massenspektrometers befindet sich der Brennpunkt des Brennlasers. Der Brennlaser kann beliebige Punkte auf der CD ansteuern und die darauf befindlichen Moleküle wegsprengen, die dann mittels des Massenspektrometers untersucht werden können.

15 Ein solchermaßen kombiniertes Gerät erlaubt es, die Bindungspartner zu analysieren, die sich bei der Kombination von zwei hochkomplexen Molekülbibliotheken bilden, während es bei den bislang bekannten Techniken nur möglich ist, zwei Molekülbibliotheken miteinander zu kombinieren und zu analysieren, die um mehrere Größenordnungen weniger komplex sind.

Statt einem Massenspektrometer kann im übrigen auch eine bewegliche Vorrichtung angebracht werden, mit der Phagen oder DNA von einzelnen Pits der CD zurückgewonnen werden können.

i) Sequenzierung komplexer DNA mittels festphasen-gekoppelter Oligos

Verwendet wird die in Beispiel f) beschriebene vollständige 12mer Oligonukleotidbibliothek. Im Unterschied zu Beispiel f) muß hierbei jedoch die Syntheserichtung "umgedreht" werden, d.h. die analog DMTr abspaltbare Schutzgruppe muß sich am dafür am 3'-OH-Ende befinden, so daß am Ende eine festphasengekoppelte Oligonukleotidbibliothek mit freien 3'-Enden vorliegt. Die Hybridisierungsbedingungen werden dabei so gewählt, daß es - wenn überhaupt - nur zu sehr wenigen Mismatches zwischen den Oligonukleotiden und den daran hybridisierten Templates kommt. Die Komplexität der festphasen-gekoppelten Oligonukleotide sollte die der zu sequenzierenden DNA übertreffen. Nicht hybridisierte cDNA wird wegwaschen. Eine Sequenzreaktion nach Sanger mit vergleichsweise vielen ddNTPs in der Reaktionslösung wird durchgeführt, so daß im Schnitt eine Verlängerung der Oligoprimer um durchschnittlich 20 Nukleotide stattfindet. Danach wird das Template durch Hitze wieder abgelöst. Anschließend wird die Sequenzinformation in dem in Beispiel h) beschriebenen kombinierten CD-Brenner-Massenspektrometer ausgelesen, wobei der Brennlaser ausgewählte, durch die Sequenzreaktion verlängerte Oligonukleotide verdampft, so daß die Sequenzinformation dann mittels des Massenspektrometers detektiert werden kann.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen, wobei elektromagnetische Wellen (Anregungslicht), insbesondere Laserlicht, auf den Träger eingestrahlt und eventuelle Lumineszenz-Reaktionen, der auf dem Träger gebundenen Molekülen, von einem Detektor erfaßt werden,
dadurch gekennzeichnet,
daß im wesentlichen nur das von den Molekülen emittierte Licht
10 (Detektionslicht) von dem Detektor erfaßt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, dadurch gekennzeichnet, daß* Anregungslicht und Detektionslicht räumlich separiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet, daß* Anregungslicht und Detektionslicht zeitlich separiert werden.
15
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Detektor und der Träger nach dem Einstrahlen oder während des Einstrahlens der elektromagnetischen Wellen relativ zueinander bewegt werden.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 4, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger und Detektor relativ zueinander so gedreht werden, daß sich die mit

den elektromagnetischen Wellen bestrahlten Moleküle in einen von dem Detektor erfaßbaren Bereich bewegen.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, *dadurch gekennzeichnet, daß die Relativbewegung von Träger und Detektor in einer Zeitspanne stattfindet, die in der Größenordnung der Fluoreszenz-Lebensdauer der angeregten Moleküle liegt.*
7. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß die elektromagnetischen Wellen nur kurzzeitig, insbesondere gepulst, auf den Träger eingestrahlt werden.*
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7, *dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor während des Einstrahlens eventuell von den bestrahlten Molekülen emittiertes Licht nicht erfaßt.*
- 15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, *dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor nach dem Einstrahlen zeitverzögert von den bestrahlten Molekülen emittiertes Licht erfaßt.*
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, *dadurch gekennzeichnet, daß ein Array aus einer Anzahl von gezielt ansteuerbaren Lichtquellen verwendet wird.*
- 20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, *dadurch gekennzeichnet, daß ein Array aus Detektoren verwendet wird.*

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, bei welchem eine Anzahl von Lichtquellen und eine Anzahl von Detektoren verwendet werden, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder Lichtquelle wenigstens ein Detektor zugeordnet ist.
- 5 13. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder einer Lichtquelle zugeordnete Detektor während des Betriebs der Lichtquelle passiv geschaltet wird.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder einer Lichtquelle zugeordnete Detektor während des Betriebs der Lichtquelle aktiv geschaltet wird.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet, daß* zur Anregung der Moleküle zwecks Erfassung bestimmter optischer Eigenschaften und als Detektor zur Erfassung dieser Eigenschaften ein Mischarray aus Mikrolasern und Detektoren verwendet wird.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Array von Detektoren als Träger der Moleküle verwendet wird.
- 20 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei ein Array von Detektoren verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* mehrere Detektoren eines Arrays von Detektoren gleichzeitig mit elektromagnetischen Wellen angeregt werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei ein Array von Detektoren verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet*, daß sich zwischen den einzelnen Detektoren eines Arrays von Detektoren eine lichtundurchlässige Schicht befindet.
- 5 19. Verfahren nach Anspruch 18, *dadurch gekennzeichnet*, daß die lichtundurchlässige Schicht zwischen den einzelnen Detektoren eines Arrays von Detektoren über die Ebene der gebundenen Moleküle herausragt.
- 10 20. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, daß der Träger ein Partikel, insbesondere eine Zelle ist, der mit einem FACS-Gerät (Fluoreszenz Aktivierter Cell Sorter oder Cell Scanner) analysiert wird.
- 15 21. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, daß der Träger mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert wird.
22. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, daß Träger mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert wird.
23. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, daß der Träger mit einem Phospho-Imager analysiert wird.
24. Verfahren nach Anspruch 1, wobei auf den Träger ein Array von Molekülen aufgebracht ist, *dadurch gekennzeichnet*, daß ausgewähl-

te Bereiche des Trägers kurzzeitig mit elektromagnetischen Wellen, insbesondere mit gepulstem Licht bestrahlt werden:

25. Verfahren nach Anspruch 24, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Bereiche des Trägers nach dem Prinzip des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops analysiert werden.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, *dadurch gekennzeichnet, daß* Fluoreszenzsignale einzelner Bildpunkte des Arrays von Molekülen in unterschiedlichen Fokussierungsebenen gemessen werden.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Stärke der Fluoreszenzsignale in unterschiedlichen Fokussierungsebenen mit der Einstellung der Fokussierungsebene rückgekoppelt wird.
28. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger ein Trennmedium, insbesondere ein chromatographisches Trennmedium ist, durch das ein Molekülgemisch zeitlich und/oder räumlich aufgetrennt wird, und daß die aufgetrennten Moleküle durch einen oder mehrere Laser analysiert werden.
29. Verfahren nach Anspruch 28, *dadurch gekennzeichnet, daß* das chromatographisch aufgetrennte Molekülgemisch durch eine Sequenzierungsreaktion entstanden ist.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein optisches Abbildungssystem zwischen das Anregungssystem und den Träger eingebracht wird.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 30, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein optisches Abbildungssystem zwischen den Träger und das Detektionssystem eingebracht wird.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein optisches Abbildungssystem verwendet wird, das wenigstens ein Linsensystem oder ein Array von Linsensystemen aufweist.
33. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens ein optisches Gitter umfaßt.
34. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens einen optischen Spiegel oder ein Array aus optischen Spiegeln umfaßt.
35. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem optische Fasern oder ein Array aus optischen Fasern umfaßt.
36. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem ein Gradienten-Index-Linsensystem

(Gradient-index-lens-System) oder ein Array aus Gradienten-Index-Linsensystemen umfaßt.

37. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger und Anregungslichtquelle relativ zueinander fixiert werden.
- 5
38. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Anregungslichtquelle ein Array von Anregungslichtquellen verwendet wird, die an den Träger fixiert sind.
- 10
39. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger, Anregungslichtquelle und Detektor relativ zueinander fixiert sind.
- 15
40. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Anregungslichtquelle ein Array von Anregungslichtquellen verwendet wird, die an dem Träger und dem Detektor fixiert sind.
- 20

41. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet*, daß ein Mischarray aus Anregungslichtquellen und Detektoren verwendet wird, die relativ zum Träger fixiert sind.
- 5
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 37 bis 41, *dadurch gekennzeichnet*, daß ein gleichmäßig mit einem Lumineszenzfarbstoff markierter Träger verwendet wird und daß das dabei erhaltene Lumineszenzsignal zum Kalibrieren der einzelnen Anregungslichtquellen des Arrays verwendet wird.
- 10
43. Verfahren zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen oder biologisch relevanter Moleküle, wobei elektromagnetische Wellen auf den Träger eingestrahlt und die bestrahlten Moleküle mit einem Detektor beobachtet werden, *dadurch gekennzeichnet*, daß ausgewählte Moleküle von dem Träger abgelöst werden und einem zweiten Detektor zur Erfassung weiterer, nicht notwendigerweise optischer Eigenschaften zugeführt werden.
- 15
44. Verfahren nach Anspruch 43, *dadurch gekennzeichnet*, daß die ausgewählten Moleküle von dem Träger automatisch abgelöst werden.
- 20
45. Verfahren nach Anspruch 43 oder 44, *dadurch gekennzeichnet*, daß die ausgewählten Moleküle vor der Erfassung weiterer, nicht

notwendigerweise optischer Eigenschaften insbesondere durch Polymerase-Kettenreaktion oder biologische Replikation vervielfältigt werden.

- 5 46. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über einen photolabilen Linker erfolgt.
- 10 47. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über eine Ionisierung bewirkt wird.
- 15 48. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle durch elektromagnetische Strahlung bewirkt wird.
- 20 49. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle durch Anlegen einer elektrischen Spannung bewirkt wird.
- 25 50. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über eine enzymatische Reaktion bewirkt wird.

51. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über Veränderung der Ionenkonzentration bewirkt wird.
52. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über Veränderung des pH-Wertes bewirkt wird.
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle mit Hilfe eines Katalysators bewirkt wird.
- 10 54. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 53, *dadurch gekennzeichnet, daß* die abgelösten Moleküle Bestandteil von Liposomen, Viruspartikeln, Retroviren, Bakteriophagen, Viroiden oder Zellen, insbesondere B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Leukozyten oder Bakterien sind.
- 15 55. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 53, *dadurch gekennzeichnet, daß* die abgelösten Moleküle Bestandteil von Komplexen aus Nukleinsäure und Protein, insbesondere von "Ribosomal display"-Komplexen oder von mit DNS-bindenden Fusionsproteinen beladener DNS, sind.
- 20 56. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 53, *dadurch gekennzeichnet, daß* die abgelösten Moleküle Bestandteil von Komplexen

aus Nukleinsäure und anderen Molekülen, insbesondere künstlich hergestellten Komplexen aus DNS und einem Liganden, sind.

57. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 56, *dadurch gekennzeichnet, daß* vom zweiten Detektor ein Massenspektrogramm der abgelösten Moleküle erzeugt wird.
58. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die ausgewählten Moleküle durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, insbesondere durch Einstrahlung von Laserlicht, von dem Träger abgelöst werden.
- 10 59. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Moleküle durch Anlegen einer elektrischen Spannung von dem Träger abgelöst werden.
60. Verfahren nach Anspruch 59, *dadurch gekennzeichnet, daß* die elektrische Spannung im Träger erzeugt wird.
- 15 61. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die ausgewählten Moleküle vor der Ablösung vom Träger durch enzymatische Reaktionen verändert werden.
62. Verfahren nach Anspruch 61, *dadurch gekennzeichnet, daß* die enzymatische Veränderung durch eine Polymerisationsreaktion

mittels einer Template-abhängigen DNA-Polymerase hervorgerufen wurde.

63. Verfahren nach Anspruch 61 oder 62, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Polymerisationsreaktion durch das Beifügen von ddNTPs zu einer Schar von unterschiedlich verlängerten Oligonukleotiden führt.
5
64. Verfahren zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 63, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger mit integriertem und von einem Detektor erfaßbaren Positionsmarkierungen verwendet wird.
10
65. Verfahren nach Anspruch 64, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Träger eine im wesentlichen handelsübliche Compact Disc (CD), eine Digital Video Disc (DVD), eine Magneto-Optical Disc (MOD) oder dergleichen verwendet wird.
15
66. Verfahren nach Anspruch 65, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchenden Moleküle auf der einen Flachseite und die Positionsmarkierungen auf der anderen Flachseite des Trägers aufgebracht werden.
- 20 67. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 bis 66, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein lichtdurchlässiger Träger verwendet wird.

68. Verfahren nach einem der Anspruch 64 bis 67, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, der einen einen Wellenlängenfilter enthält.
- 5 69. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 67, *dadurch gekennzeichnet, daß* zwischen Träger und Detektor wenigstens ein Wellenlängenfilter geschaltet wird.
- 10 70. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 69, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine Molekülbibliothek aufgebracht ist.
- 15 71. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine vorzugsweise vollständige Peptidbibliothek, die L-Aminosäuren enthält, insbesondere eine 4mer, 5mer, 6mer oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht ist.
- 20 72. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine vorzugsweise vollständige Peptidbibliothek, die D-Aminosäuren enthält, insbesondere eine 4mer, 5mer, 6mer oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht ist.
73. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine Peptidbiblio-

theke aus L- und D-Aminosäuren, insbesondere eine 4mer, 5mer, 6mer oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht ist.

74. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine Aptamerbibliothek aufgebracht ist.
- 5
75. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine Oligosaccharidbibliothek aufgebracht ist.
- 10
76. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine mit Hilfe chemischer Kombinatorik hergestellte Molekülbibliothek aufgebracht ist.
- 15
77. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine vorzugsweise vollständige Oligonukleotidbibliothek, insbesondere eine 12-, 13-, 14- oder 15mer Oligonukleotidbibliothek aufgebracht ist.
78. Verfahren nach Ansprache 77, *dadurch gekennzeichnet, daß* die einzelnen Monomere der Oligonukleotidbibliothek Spiegelbilder der natürlicherweise vorkommenden Monomere sind.

79. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* auf ein Träger verwendet wird, auf den Proteine, insbesondere rekombinant exprimierte Proteine, DNA-Fragmente, PCR-Produkte, cDNA-Fragmente oder RNA-Fragmente aufgebracht sind.
80. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 79, wobei ein Träger verwendet wird, auf den eine Molekülbibliothek aufgebracht ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Molekülbibliothek chemisch modifiziert wurde, insbesondere durch eine Additionsreaktion, eine Eliminierungsreaktion, eine Substitutionsreaktion, eine Umlagerungsreaktion oder eine Anlagerungsreaktion mit bereits am Träger gebundenen Substanzen.
81. Verfahren nach einem der Ansprüche 70 bis 80, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger mit einer zu untersuchenden Flüssigkeit in Kontakt gebracht wird.
82. Verfahren nach Anspruch 81, *dadurch gekennzeichnet, daß* es sich bei der zu untersuchenden Flüssigkeit um Blut, Blutserum, Urin, Faeces, Lymphe, Speichel, Fruchtblasenflüssigkeit, Magensaft, Erbrochenes, Schweiß, Samenflüssigkeit, Muttermilch, Tränenflüssigkeit, um eine Antikörper enthaltende Flüssigkeit oder um einen Extrakt aus den angegebenen Flüssigkeiten handelt.

83. Verfahren nach Anspruch 82, wobei die zu untersuchende Flüssigkeit insbesondere ein Blutserum ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird.
- 5 84. Verfahren nach Anspruch 83, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline des Typs E spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird.
- 10 85. Verfahren nach Anspruch 83, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline des Typs M spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird.
86. Verfahren nach Anspruch 83, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline des Typs G spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird
- 15 87. Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 83, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline des Typs A spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird.
- 20 88. Verfahren nach einem der Ansprüche 70 bis 80, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger mit zu untersuchender DNA in Kontakt gebracht wird.

89. Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 89, wobei DNA oder eine Immunglobuline enthaltende Flüssigkeit zu untersuchen ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit oder die zu untersuchende DNA nach oder vor dem In-Kontakt-Bringen mit dem Träger mit einem mit Immunglobulinen oder mit DNA reagierenden, insbesondere Bindungen eingehenden Stoff in Kontakt gebracht wird.
- 5
90. Verfahren nach Anspruch 89, *dadurch gekennzeichnet, daß* der mit Immunglobulinen oder DNA reagierende Stoff vor dem In-Kontakt-Bringen mit der zu untersuchenden Flüssigkeit oder der zu untersuchenden DNA mit einem zur Lumineszenz anregbaren Stoff eingefärbt wird.
- 10
91. Verfahren nach Anspruch 89 oder 90, *dadurch gekennzeichnet, daß* der mit Immunglobulinen oder DNA reagierende Stoff vor oder während des In-Kontakt-Bringens mit der zu untersuchenden Flüssigkeit oder der zu untersuchenden DNA mit einem weiteren Stoff gekoppelt wird, der eine Lumineszenz hervorrufen kann, insbesondere mit Enzymen oder Vorstufen luminescenter Stoffe.
92. Verfahren nach Anspruch 91, *dadurch gekennzeichnet, daß* der weitere Stoff ein Enzym ist, insbesondere Meerrettich-Peroxidase, Alkalische Phosphatase, Beta-Galaktosidase, Glukose-Oxidase, Lactat-Dehydrogenase oder Luziferase, oder eine Bindung von Enzymen bewirkt.
- 20

- 5 93. Verfahren nach einem der Ansprüche 90 bis 92, *dadurch gekennzeichnet, daß* als zur Lumineszenz anregbarer Stoff ein durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen, insbesondere Laserlicht oder Licht aus Leuchtdioden zur Fluoreszenz anregbarer Farbstoff verwendet wird.
- 10 94. Verfahren zur systematischen Klassifizierung und Segmentierung von pathologischen Mustern, insbesondere zur Bestimmung von diagnostischen Markern, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 93 für eine Vielzahl von Testpersonen durchgeführt wird und in den Testergebnissen die Abweichungen von der Normalverteilung ermittelt werden.
- 15 95. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* von jeder Testpersonen jeweils eine Probe Blutserum gewonnen und nach einem der genannten Verfahren untersucht wird.
- 20 96. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an Krebs erkrankt sind, ermittelt werden.
97. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor, während oder nach der Gewinnung des Blutserums einen Herzinfarkt oder Schlaganfall erlitten haben, ermittelt werden.

98. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an der Parkinsonschen Krankheit erkrankt sind, ermittelt werden.*
- 5 99. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an Multipler Sklerose erkrankt sind, ermittelt werden.*
- 10 100. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an der Alzheimerschen Krankheit erkrankt sind, ermittelt werden.*
- 15 101. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor, während oder nach der Gewinnung des Blutserums an Infektionskrankheiten erkrankt sind, ermittelt werden.*
- 20 102. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an einer Autoimmunkrankheit erkrankt sind, ermittelt werden.*

103. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor, während oder nach der Gewinnung des Blutserums Allergiker waren oder wurden, ermittelt werden.

5. 104. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an Morbus Crohn erkrankt sind, ermittelt werden.

10 105. Verfahren zur automatischen Klassifizierung von Signalen, insbesondere zur Bestimmung von diagnostischen Mustern, *dadurch gekennzeichnet, daß* die nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 104 erhaltenen Signale mit Strukturparametern der entsprechenden Moleküle der Molekülbibliothek in Beziehung gebracht werden und so Korrelationen aufgefunden werden; insbesondere solche, die eine diagnostische Beurteilung von Mustern unbekannter Proben ermöglichen.

20 106. Verfahren zur automatischen Klassifizierung von Signalen, *dadurch gekennzeichnet, daß* die nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 104 erhaltenen Signale mit Strukturparametern der entsprechenden Moleküle der Molekülbibliothek in Beziehung gebracht werden, insbesondere um gemeinsame Strukturmerkmale der aufgefundenen Moleküle aufzufinden.

107. Verfahren nach Anspruch 106, *dadurch gekennzeichnet, daß* so definierte Strukturmerkmale der aufgefundenen Moleküle als Leitstrukturen für die Entwicklung funktionshomologer anderer Moleküle, insbesonders therapeutisch anwendbarer Moleküle, dienen.
- 5 108. Verfahren zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, insbesondere nach einem der vorangehenden Ansprüche, *dadurch gekennzeichnet, daß* an einem Träger ein Array von gezielt anregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, insbesondere ein Array von Mikrolasern oder Leucht-dioden befestigt wird.
- 10 109. Verfahren nach Anspruch 108, *dadurch gekennzeichnet, daß* das Array an dem Träger befestigt wird, bevor die auf dem Träger gebundenen Moleküle, insbesondere eine Peptid-, Aptamer-, Oligosaccharid-, Oligonukleotidbibliothek oder eine mit Hilfe chemischer Kombinatorik hergestellte Molekülbibliothek, auf den Träger aufgebracht werden.
- 20 110. Verfahren nach Anspruch 108 oder 109, *dadurch gekennzeichnet, daß* das Array an dem Detektor befestigt wird, bevor die auf dem Träger gebundenen Moleküle, insbesondere eine Peptid-, Aptamer-, Oligosaccharid-, Oligonukleotidbibliothek oder eine mit Hilfe chemischer Kombinatorik hergestellte Molekülbibliothek, auf den Träger aufgebracht werden.

111. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 110, *dadurch gekennzeichnet, daß* das Array an dem Träger und an einem Detektor oder einem Array von Detektoren befestigt wird.
- 5 112. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 111, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Mischarray von gezielt anregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, insbesondere von Mikrolasern oder Leuchtdioden, und Detektoren verwendet wird.
- 10 113. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 112, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Befestigung des Trägers an den Array von gezielt anregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, insbesondere an einen Array von Mikrolasern oder an einen Array von Leuchtdioden, während des Aufbringens der Molekülbibliothek, des In-Kontakt-Bringens der Molekülbibliothek mit einer zu untersuchenden Flüssigkeit nach einem der Ansprüche 81 bis 93, bis zum Auslesen der Lumineszenz-Reaktion erhalten bleibt.
- D 15 114. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 112, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Abbildungssystem nach Anspruch 30 bis 36 das Array von Anregungslasern auf den Träger abbilden.
- 20 115. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 114, *dadurch gekennzeichnet, daß* Detektor, die gezielt anregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung und Träger zumindest während der Untersuchung relativ zueinander fixiert sind.

116. Verfahren zum Aufbringen einer Peptidbibliothek auf einen Träger, insbesondere auf einen, in einem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche verwendbaren Träger,
dadurch gekennzeichnet, daß

- 5 - eine Oberfläche des Trägers mit einer Kunststoffschicht überzogen wird, die freie Aminogruppen enthält und für die Festphasensynthese einer Peptidbibliothek geeignet ist,
- 10 - daß freie Aminogruppen mit einer durch Licht-abspaltbaren Schutzgruppe abgeblockt werden,
- 15 - daß mittels eines Lasers Schutzgruppen in bestimmten Bereichen des Trägers abgespalten werden,
- 20 - daß eine aktivierte Aminosäure, deren eigene Aminogruppe durch die durch Licht abspaltbare Schutzgruppe blockiert ist, auf den Träger so aufgebracht wird, daß sich die Aminosäure auf dem Träger verteilt und an die freien Aminogruppen ankoppelt,
- daß die Verfahrensschritte "Abspalten von Schutzgruppen in bestimmten Bereichen des Trägers" und "Zuführen einer aktivierten Aminosäure, deren eigene Aminogruppe durch die durch Licht abspaltbare Schutzgruppe blockiert ist", für verschiedene, vorzugsweise alle 20 Aminosäuren wiederholt wird und
- daß schließlich die Schutzgruppen von allen synthetisierten Peptiden abgespalten werden.

117. Verfahren zum Aufbringen einer Peptidbibliothek auf einen Träger, insbesondere auf einen in einem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche verwendbaren Träger,
dadurch gekennzeichnet, daß

- 5 - in einem Spacer, der eine freie, mit einer durch Licht abspaltbaren Schutzgruppe abgeblockte Amino- oder OH-Gruppe enthält, Monomere für die Synthese einer Molekülbibliothek aktiviert und mit einem Lösungsmittel, das einen Schmelzpunkt zwischen 0 °C und 40 °C hat, bei einer Temperatur, bei der das Lösungsmittel flüssig ist, gelöst werden,
- 10 - daß dem Gemisch aus Spacer und Lösungsmittel ein Farbstoff, der von einem Laser eingestrahltes Licht absorbieren kann, zugeführt wird,
- 15 - daß das Gemisch tiefgefroren und pulverisiert wird,
- 20 - daß das pulverisierte und tiefgefrorene Gemisch im festen Zustand über dem Träger zerstäubt wird,
- 25 - daß ausgewählte Bereiche auf dem Träger mit elektromagnetischen Wellen, insbesondere Laserlicht, derart bestrahlt werden, daß es zu einem Auftauen des Gemisches und einer Ankopplung an den Träger kommt,
- daß das nicht verflüssigte, nicht gekoppelte Gemisch mit Lösungsmittel, vorzugsweise erwärmt Lösungsmittel vom Träger gewaschen wird und
- daß die Schutzgruppe durch Einstrahlung von Licht abgespalten wird.

118. Verfahren zur Aufbringung einer Molekülbibliothek auf einen Träger, insbesondere eine Flachseite einer Compact Disc,
dadurch gekennzeichnet,

- daß mittels einer Vorrichtung, insbesondere mittels einer eine Düse aufweisenden Vorrichtung, Moleküle auf den Träger aufgebracht werden und
- daß ausgewählte Bereiche des Trägers mit Laserlicht derart bestrahlt werden, daß es in diesen Bereichen zu einer Verankerung der aufgebrachten Moleküle am Träger kommt.

10 119. Verfahren zum Aufbringen von Substanzen (5), insbesondere von Molekülen auf einen Träger (12),
dadurch gekennzeichnet,

- daß eine immobilisierte Substanz (9) in einem lokal engbegrenzten, ausgewählten Bereich (7) durch Veränderung der physikalischen Umgebung, insbesondere der Matrixschicht (3), beweglich gemacht wird,
- daß die so beweglich gemachte Substanz (11) durch einen physikalischen Prozeß in die Nähe des Trägers (12), insbesondere der Trägeroberfläche (46), gebracht wird,
- daß die so beweglich gemachte Substanz (11) an auf dem Träger (12) befindliche Moleküle (2) oder Atome bindet, oder ein Aggregat (4) bildet, oder mit diesen eine chemische Reaktion eingehet,
- daß die so beweglich gemachten Substanzen (11) viele unterschiedliche Substanzen (15) sind oder ergeben.

120. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz geschmolzen wird.
- 5 121. Verfahren nach Anspruch 119 oder 120, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen geschmolzen wird.
122. Verfahren nach Anspruch 119 oder 120, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers geschmolzen wird.
- 10 123. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz in einen gel-artigen Zustand gebracht wird.
- 15 124. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 123, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen in einen gel-artigen Zustand gebracht wird.
- 20 125. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 123, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers in einen gel-artigen Zustand gebracht wird.

126. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz thermisch abgespalten wird.

5 127. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 126, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen thermisch abgespalten wird.

10 128. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 126, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers thermisch abgespalten wird.

129. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz löslich gemacht wird.

15 130. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 129, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen löslich gemacht wird.

20 131. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 129, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher

immobilisierte Substanz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers löslich gemacht wird.

- 5 132. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen des Trägers eine vorher immobilisierte Substanz durch Freisetzung aus cage-Strukturen löslich gemacht wird, insbesondere durch Freisetzung aus Fullerenen oder Nanotubes.
- 10 133. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 132, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Freisetzung der Moleküle durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen oder Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers bewirkt wird.
- 15 134. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 133, *dadurch gekennzeichnet, daß* die vorher feste oder immobilisierte Substanz einen Stoff enthält, der eingestrahlte elektromagnetische Wellen absorbiert.
- 20 135. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 134, *dadurch gekennzeichnet, daß* die vorher feste oder immobilisierte Substanz Moleküle enthält, die nach Beweglichmachung an den Träger koppeln können.
136. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 134, *dadurch gekennzeichnet, daß* die vorher feste oder immobilisierte Substanz

Moleküle enthält, die nach Beweglichmachung mit an den Träger bereits gekoppelten Molekülen eine Reaktion eingehen können.

- 5 137. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 134, *dadurch gekennzeichnet, daß* die vorher feste oder immobilisierte Substanz aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere für die Molekülsynthese enthält, die im beweglichen Zustand an den Träger koppeln können.
- 10 138. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 137, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste oder immobilisierte Substanz einen Schmelzpunkt zwischen 0 °C und 45 °C hat.
- 15 139. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 138, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Schmelzpunkt zwischen 0 °C und 45 °C durch die Mischung von Lösungsmitteln mit unterschiedlichem Schmelzpunkt erreicht wird.
- 20 140. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 139, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste Substanz eine weitere Substanz enthält, die eingestrahlte elektromagnetische Wellen absorbiert, insbesondere Graphitpartikel.
141. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 139, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste Substanz eine weitere Substanz enthält, insbesondere Fullerene oder Nanotubes, die eingestrahlte elektromagnetische Wellen absorbiert.

142. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 139, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste Substanz eine weitere Substanz, insbesondere Fullerene oder Nanotubes enthält, die eine oder mehrere weitere Substanzen enthalten, die eingestrahlte elektromagnetische Wellen absorbieren.
- 5
143. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 142, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste oder immobilisierte Substanz pulverisiert wird, insbesondere, nachdem sie tiefgefroren wurde.
- 10
144. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 143, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste oder zu immobilisierende Substanz vor der Immobilisierung elektrostatisch aufgeladen wird.
- 15
145. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 144, *dadurch gekennzeichnet, daß* die pulverisierte Substanz im festen Zustand über dem Träger zerstäubt wird, insbesondere in tiefgefrorener Form.
146. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 145, *dadurch gekennzeichnet, daß* die pulverisierte Substanz im festen Zustand über dem Träger zerstäubt wird und mit einer wieder entfernbaren Abdeckung vor dem Verdunsten oder Sublimieren geschützt wird.
- 20 147. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 146, *dadurch gekennzeichnet, daß* pulverisierte Substanzen, die unterschiedliche

an den Träger zu koppelnde Moleküle enthalten, im festen Zustand auf den Träger aufgebracht werden.

148. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 147, *dadurch gekennzeichnet, daß* pulverisierte Substanzen, die unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle enthalten, im festen Zustand auf eine wieder entfernbare Abdeckung aufgebracht werden und diese Abdeckung auf den Träger gelegt wird.
149. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 148, *dadurch gekennzeichnet, daß* nach Anspruch 144 geladene Substanzen dadurch an ausgewählte Teile des Trägers gebunden werden, an denen eine entgegengesetzte Aufladung vorliegt.
150. Verfahren nach Anspruch 149, *dadurch gekennzeichnet, daß* die lokale Aufladung bestimmter Teile des Trägers durch Anlegen einer Spannung erfolgt.
151. Verfahren nach Anspruch 149, *dadurch gekennzeichnet, daß* die lokale Aufladung ausgewählter Teile des Trägers durch Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen erfolgt.
152. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger aufgebrachten Substanzen durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, insbesondere Laserlicht, fixiert werden.

153. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß die auf dem Träger lokal freigesetzten Substanzen durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, insbesondere Laserlicht, fixiert werden.*
- 5 154. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß die auf den Träger aufgebrachten Substanzen chemisch fixiert werden.*
- 10 155. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß die auf den Träger lokal freigesetzten Substanzen chemisch fixiert werden.*
156. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß die auf den Träger aufgebrachten Substanzen thermisch fixiert werden.*
157. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß die auf den Träger lokal freigesetzten Substanzen thermisch fixiert werden.*
158. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß die auf den Träger aufgebrachten Substanzen durch Anlegen einer elektrischen Spannung fixiert werden.*

159. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf dem Träger lokal freigesetzten Substanzen durch Anlegen einer elektrischen Spannung fixiert werden.

5 160. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, Alkylierungs-, Biotinylierungs-, Glykosylierungs-Phosphorylierungs- oder Halogenierungsreagentien sind.

10 161. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, an Thiole oder die epsilon-Aminogruppen von Lysinen koppeln können.

15 162. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, organische Moleküle, insbesondere Heterozyklen, aromatische Gruppen, Aldehydgruppen, Ketogruppen, Imidazolgruppen, Zucker, Lipide, Ester, Phosphatgruppen oder Peptidbindungen enthalten.

20 163. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind,

Cofaktoren, insbesondere Häm, Biotin, Coenzym-A, Retinal oder Chlorophyll enthalten.

- 5
- 10
- 20
164. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, eine chemische Reaktion, insbesondere eine Additionsreaktion, eine Eliminierungsreaktion, eine Substitutionsreaktion, eine Umlagerungsreaktion oder eine Anlagerungsreaktion mit bereits am Träger gebundenen Substanzen eingehen können.
 165. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, eine chemische Reaktion, insbesondere eine Additionsreaktion, eine Eliminierungsreaktion, eine Substitutionsreaktion, eine Umlagerungsreaktion oder eine Anlagerungsreaktion anderer Substanzen mit bereits am Träger gebundenen Molekülen katalysieren.
 166. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 165, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Bereiche auf dem Träger mit elektromagnetischen Wellen, insbesondere Licht, insbesonder mit wiederholbar gepulstem Laserlicht, derart bestrahlt werden, daß die feste Substanz in ausgewählten Bereichen beweglich gemacht wird, wodurch die in der festen Substanz eingeschlossenen Moleküle an den Träger koppeln können.

167. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 166, *dadurch gekennzeichnet, daß* nicht beweglich gemachte, nicht gekoppelte Substanzen mit Lösungsmittel, vorzugsweise erwärmtem Lösungsmittel vom Träger gewaschen werden.
- 5 168. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 167, *dadurch gekennzeichnet, daß* nicht beweglich gemachte, nicht gekoppelte Substanzen mechanisch, insbesondere mithilfe eines Luftstroms vom Träger entfernt werden.
- 10 169. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 168, *dadurch gekennzeichnet, daß* die beweglich gemachten Substanzen aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere der D- oder L- Aminosäuren sind.
- 15 170. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 169, *dadurch gekennzeichnet, daß* die beweglich gemachten Substanzen aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere von natürlichen Aminosäuren oder Multimere natürlicher Aminosäuren sind, die nicht notwendigerweise Bestandteile natürlicher Proteine sein müssen, insbesondere 4-Hydroxyprolin, Hydroxylysin, Desmosin, Isodesmosin, epsilon-N-Methyllysin, epsilon-N-Trimethyllysin, Methylhistidin, Homocystein, Homoserin, Citrullin, Ornithin, Canavanin, Djenkolsäure, β-Cyanoalanin, Cystin, Gluthation.
- 20 171. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 169, *dadurch gekennzeichnet, daß* die beweglich gemachten Substanzen aktivierte

Monomere, Dimere oder Trimere von künstlichen Aminosäuren sind, die nicht Bestandteile natürlicher Proteine sind.

172. Verfahren nach einem der Ansprüche 169 bis 171, *dadurch gekennzeichnet, daß* die aktivierten Aminosäuren oder Aminosäurederivate nach dem Beweglichmachen mit Standardmethoden an den Träger gekoppelt werden.
173. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 168, *dadurch gekennzeichnet, daß* die aktivierten Monomere, Dimere oder Trimere Nukleoside oder ihre Spiegelbilder sind.
- 10 174. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 168, *dadurch gekennzeichnet, daß* die aktivierten Monomere, Dimere oder Trimere derivatisierte Nukleoside oder ihre Spiegelbilder sind, insbesondere Vorstufen der Aptamersynthese.
- 15 175. Verfahren nach Anspruch 174, *dadurch gekennzeichnet, daß* die aktivierten Nukleoside oder derivatisierten Nukleoside nach dem Beweglichmachen mit Standardmethoden an den Träger gekoppelt werden.
- 20 176. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 175, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Kopplungsreaktionen nacheinander mit verschiedenen oder gleichen weiteren aktivierten Monomeren, Dimeren oder Trimeren, insbesondere mit aktivierten D- oder L-

Aminosäuren oder mit aktivierten Nucleosiden, ihren Derivaten oder ihren Spiegelbildern, durchgeführt werden.

- 5 177. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 176, *dadurch gekennzeichnet, daß* nach einem ersten Zyklus von Kopplungsreaktionen Schutzgruppen mit Standardmethoden abgespalten werden, wodurch insbesondere freie Aminogruppen oder Hydroxylgruppen entstehen, an die weitere aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere koppeln können.
- 10 178. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 177, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein oder mehrere weitere Zyklen von Kopplungsreaktionen die an den Träger gebundenen Moleküle um weitere Monomere, Dimere oder Trimere verlängern.
- 15 179. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 177, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein oder mehrere weitere Zyklen von nicht notwendigerweise identischen Reaktionen die an den Träger gebundenen Moleküle modifizieren.
- 20 180. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 179, *dadurch gekennzeichnet, daß* nach erfolgter Synthese die Schutzgruppen von den synthetisierten Oligomeren abgespalten werden, wobei die synthetisierten Moleküle an den Träger gebundenen bleiben.

181. Verfahren nach Anspruch 118, *dadurch gekennzeichne*, daß vor dem Aufbringen der zu verankernden Molekülen eine bei den jeweiligen Umgebungstemperaturen feste Substanz auf den Träger gebracht wird und daß zur Verankerung der Moleküle diese Substanz geschmolzen wird.
- 5
182. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 181, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger eine Compact Disc ist.
- 10
183. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 182, *dadurch gekennzeichnet, daß* an dem Träger ein Array von Detektoren und/oder ein Array von Lichtquellen fixiert ist.
- 15
184. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 183, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger in unterschiedliche Bereiche unterteilt wird, insbesondere 20 unterschiedliche Bereiche bei der Peptidsynthese, und daß für jeden dieser Bereiche eine andere Standardsynthese durchgeführt wird, insbesondere eine Standard-Peptid-Synthese mit 20 verschiedenen aktivierten Aminosäurederivaten, die fMoc-Schutzgruppen enthalten.
- 20
185. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 183, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger in unterschiedliche Bereiche unterteilt wird, insbesondere jeweils einen Bereich für jedes eingesetztes Molekül nach einem der Ansprüche 169 bis 172, und daß für jeden dieser Bereiche eine Synthese durchgeführt wird,

insbesondere eine Standard-Peptidsynthese mit weiteren verschiedenen aktivierten Aminosäurederivaten, die fMoc-Schutzgruppen enthalten, wobei die Reihenfolge der Syntheseschritte nicht mit einem bestimmten Typ der Moleküle nach einem der den Ansprüche 5 169 bis 172 beginnen oder enden muß.

186. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 185, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder der in Anspruch 184 genannten unterschiedlichen Bereiche erneut in unterschiedliche Bereiche unterteilt wird, so daß insbesondere 400 unterschiedliche Bereiche bei der 10 Peptidsynthese entstehen, und daß für jeden dieser Bereiche eine andere Standardsynthese durchgeführt wird, insbesondere eine Standard-Peptid-Synthese mit 20 verschiedenen aktivierten Aminosäurederivaten, die fMoc-Schutzgruppen enthalten.

187. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 184, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder der in den Ansprüchen 184 bis 186 genannten unterschiedlichen Bereiche erneut in unterschiedliche Bereiche unterteilt wird, sodaß insbesondere eine Vielzahl unterschiedliche Bereiche bei der Peptidsynthese entstehen, und daß für jeden dieser Bereiche eine andere Standardsynthese durchgeführt wird, insbesondere eine Standard-Peptid-Synthese mit 20 verschiedenen aktivierten Aminosäurederivaten, die fMoc-Schutzgruppen enthalten, oder eine Standardsynthese mit Molekülen nach einer der 20 den Ansprüche 169 bis 172.

188. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 187, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Unterteilung des Trägers in unterschiedliche Bereiche, insbesondere jeweils in einen Bereich für jedes eingesetztes Molekül, nach den in einem oder mehreren der Ansprüche 184 bis 187 dargestellten Weise mehrfach wiederholt wird, wobei die Unterteilung nicht notwendigerweise die gleiche Anzahl Bereiche in jedem Schritt enthalten muß.
189. Verfahren zum lithographischen Aufbringen einer Molekülbibliothek auf einen Träger, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Träger eine Compact Disc verwendet wird.
190. Verfahren zum lithographischen Aufbringen einer Molekülbibliothek, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger nach einem der Ansprüche 108 bis 115 an einem Array von Mikrolasern fixiert wird.
191. Verfahren nach 189 oder 190, *dadurch gekennzeichnet, daß* reaktive Gruppen, insbesondere freie Aminogruppen, Carboxylgruppen, Thiolgruppen oder Hydroxylgruppen, mit durch elektromagnetische Wellen abspaltbaren Schutzgruppen abgeblockt werden.
192. Verfahren nach einem der Ansprüche 189 bis 191, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Bereiche mit elektromagnetischen Wellen bestrahlt werden, so daß durch Licht abspaltbare Schutzgruppen abgespalten werden.

193. Verfahren nach einem der Ansprüche 189 oder 190, *dadurch gekennzeichnet, daß* eine für elektromagnetische Wellen empfindliche Schutzschicht auf den Träger aufgebracht wird.
194. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190 oder 193, *dadurch gekennzeichnet, daß* nach der Bestrahlung von ausgewählten Bereichen des Trägers mit elektromagnetischen Wellen, die für elektromagnetische Wellen empfindliche Schutzschicht an den bestrahlten Bereichen entfernt werden kann.
195. Verfahren nach Anspruch 189 oder 190, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger an ausgewählten Bereichen durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen, insbesondere von Laserlicht, elektrostatisch aufgeladen oder magnetisiert wird.
196. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190 oder 195, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger mit elektrisch geladenen oder magnetisierten aktivierten Monomeren, Dimeren oder Trimeren in Kontakt gebracht wird.
197. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195 oder 196, *dadurch gekennzeichnet, daß* nicht gekoppelte aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere weggewaschen werden, erneut ausgewählte Bereiche des Trägers durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen elektrostatisch aufgeladen oder magnetisiert werden und der Träger anschließend mit anderen elektrisch geladenen oder magneti-

siererten aktivierten Monomeren, Dimeren oder Trimeren in Kontakt gebracht wird.

198. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195, 196 oder 197, *dadurch gekennzeichnet, daß* der in den Ansprüchen 195 bis 197 beschriebene Vorgang, insbesondere für 20 verschiedene aktivierte Aminosäurenderivate, wiederholt wird, Schutzgruppen abgespalten werden und ein erneuter Synthesezyklus durchgeführt wird.
199. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190 oder 195, *dadurch gekennzeichnet, daß* magnetisierte oder elektrisch geladene Substanzen, die unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle enthalten, auf den Träger aufgebracht werden.
200. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195 oder 199, *dadurch gekennzeichnet, daß* magnetisierte oder elektrisch geladene Substanzen, die unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle enthalten, auf eine wieder entfernbare Abdeckung aufgebracht werden und diese Abdeckung auf den Träger gelegt wird.
201. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195, 199 oder 200, *dadurch gekennzeichnet, daß* unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle zusammen mit magnetisierten oder elektrisch geladenen Substanzen auf den Träger aufgebracht werden.

202. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195, 199, 200 oder 201, *dadurch gekennzeichnet, daß* unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle zusammen mit magnetisierten oder elektrisch geladenen Substanzen auf eine wieder entfernbarer Abdeckung aufgebracht werden und diese Abdeckung auf den Träger gelegt wird.
- 5
203. Verfahren nach einem der Ansprüche 189 oder 190, *dadurch gekennzeichnet, daß* unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle mit einem Drucker, insbesondere Tintenstrahldrucker auf 10 den Träger aufgebracht werden.
- 10
204. Verfahren nach Anspruch 203, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger aufgebrachten Substanzen gemäß einem der Ansprüche 152 bis 159 fixiert werden.
205. Verfahren zur Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen (6), insbesondere Laserlicht, auf einen Träger (12), insbesondere auf 15 einen in einem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche verwendbaren Träger, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Bereiche (7) des Trägers (12) schnell und wiederholbar ortsgenau bestrahlt werden, daß die ausgewählten Bereiche (7) des Trägers (12) mit unterschiedlichen Molekülen (2) oder mit unterschiedlichen Aggregaten an diese Moleküle (4) beladen sind oder beladen werden, daß die unterschiedlichen Moleküle (2) oder die Aggregate an diese Moleküle (4), mit anderen Molekülen (8) in Wechselwirkung treten,

daß die auf den ausgewählten Bereichen (7) sich befindenden unterschiedlichen Moleküle (2) oder die Aggregate an diese Moleküle (4) oder die anderen Moleküle (8) mit den eingestrahlten elektromagnetischen Wellen (6) wechselwirken und daß durch die Wechselwirkung der eingestrahlten elektromagnetischen Wellen (6) mit den Molekülen (2) oder mit Aggregaten an diese Moleküle (4) oder mit den anderen Molekülen (8) lokale physikalische Prozesse in Gang gesetzt werden.

206. Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger (48) gebundenen Molekülen (50; 52), insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, mit Mitteln, insbesondere wenigstens einem Laser (42, 44), zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen (62) auf den Träger und wenigstens einem Detektor (56, 58) zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen der bestrahlten Moleküle,

dadurch gekennzeichnet,

- daß die Mittel (42, 44) zum Einstrahlen der Wellen zur Erzeugung kurzzeitiger elektromagnetischer Wellenimpulse ausgebildet sind und
- daß die Mittel derart mit dem bzw. den Detektor/Detektoren (56, 58) gekoppelt sind, daß der bzw. die Detektor/Detektoren während des Einstrahlens eines Wellenimpulses eventuell erzeugte Lumineszenz-Reaktionen nicht erfaßt.

207. Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger (48) gebundenen Molekülen (50, 52), insbesondere biologischen Molekülen, mit Mitteln, insbesondere wenigstens einem Laser (42, 44), zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen (62) auf den Träger und wenigstens einem Detektor (56, 58) zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen der bestrahlten Moleküle,

dadurch gekennzeichnet,

- daß die Mittel (42, 44) zum Einstrahlen der Wellen derart mit dem bzw. den Detektor/Detektoren (56, 58) gekoppelt sind, daß die von den Mitteln erzeugten Wellen (62) zumindest zum überwiegenden Teil von dem bzw. den Detektor/Detektoren (56, 58) nicht erfaßt werden.

208. Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger (12) gebundenen Molekülen (14), insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, mit Mitteln, insbesondere wenigstens einem Laser, zum Einstrahlen elektromagnetischer Wellen auf den Träger und wenigstens einem Detektor (28) zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen der bestrahlten Moleküle, *dadurch gekennzeichnet,*

- daß Mittel zur Bewegung des Trägers relativ zum Detektor und zu den Mitteln zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen derart vorgesehen sind,
- daß mit elektromagnetischen Wellen bestrahlte Bereiche des Trägers nach dem Einstrahlen der Wellen aus dem Einstrahlbe-

reich heraus- und in den Erfassungsbereich des Detektors hineinbewegbar sind.

209. Vorrichtung nach Anspruch 208, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger (14) drehbar gelagert ist.

210. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 209, *dadurch gekennzeichnet, daß* zwischen Träger (46) und Detektor (56, 58) wenigstens ein Wellenlängenfilter (60) geschaltet ist.

211. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 210, *dadurch gekennzeichnet, daß* zwischen dem Träger und dem Detektor und/oder zwischen dem Träger und der anregenden Lichtquelle wenigstens ein optisches Abbildungssystem vorgesehen ist.

212. Vorrichtung nach Anspruch 211, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens ein Linsensystem oder ein Array aus Linsensystemen umfaßt.

213. Vorrichtung nach Anspruch 211 oder 212, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens ein optisches Gitter enthält.

214. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 211 bis 213, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens

einen optischen Spiegel oder ein Array aus optischen Spiegeln aufweist.

- 5
215. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 211 bis 214, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem optische Fasern oder ein Array aus optischen Fasern umfaßt.
216. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 211 bis 215, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens ein Gradienten-Index-Linsensystem (Gradient-index-lens-System) oder ein Array aus Gradienten-Index-Linsensystemen aufweist.
- 10 217. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 216, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger und Anregungslichtquelle relativ zueinander fixiert sind.
- 15 218. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 217, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle vorgesehen ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Anregungslichtquelle ein Array von Anregungslichtquellen vorgesehen ist, das an dem Träger fixiert ist.
- 20 219. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 218, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle vorgesehen ist, *dadurch gekennzeichnet, daß*

Träger, Anregungslichtquelle und Detektor relativ zueinander fixiert sind.

- 5
220. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 219, *dadurch gekennzeichnet, daß* an dem Träger ein Array von gezielt erregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, insbesondere ein Array von Mikrolasern oder Leuchtdioden befestigt ist.
- 10
221. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 220, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Array (54) von Detektoren (56, 58) vorgesehen ist.
- 15
222. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 221, *dadurch gekennzeichnet, daß* Detektoren (56, 58), Träger (48) und Anregungslichtquellen (42, 44) relativ zueinander fixiert sind.
- 20
223. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 222, *dadurch gekennzeichnet, daß* zur Anregung der Moleküle zwecks Erfassung bestimmter optischer Eigenschaften und als Detektor zur Erfassung dieser Eigenschaften ein Mischarray aus Mikrolasern oder Leuchtdioden und/oder Detektoren vorgesehen ist.
224. Vorrichtung zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen, mit Mitteln zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen auf

den Träger und einem Detektor zur Beobachtung der bestrahlten Moleküle,

dadurch gekennzeichnet,

- daß Mittel zum Ablösen ausgewählter Moleküle vorgesehen sind.

5

225. Vorrichtung nach Anspruch 224, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Detektor zweiter Art vorgesehen ist, mit dem bestimmte Eigenschaften der abgelösten Moleküle erfaßbar sind.

10

226. Vorrichtung nach Anspruch 225, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Detektor zweiter Art ein Spektrometer, insbesondere ein Massenspektrometer ist.

227. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 224 bis 226, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Mittel zum Ablösen einen Laser umfassen.

15

228. Vorrichtung nach Anspruch 227, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Leistung des Lasers steuerbar ist.

229. Träger (12) für Moleküle (14), insbesondere biologische Moleküle, insbesondere zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 205, *dadurch gekennzeichnet,*

20

- daß der Träger integrierte Positionsmarkierungen (20) aufweist.

230. Träger nach Anspruch 229, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Positionsmarkierungen (20) von einem optoelektronischen Abtastsystem erfaßbar sind.
- 5 231. Träger nach Anspruch 230, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger eine im wesentlichen handelsübliche Compact Disc (12), eine Digital Video Disc oder eine Magneto Optical Disc ist.
- 10 232. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 231, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger lichtdurchlässig ausgebildet ist.
- 15 233. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 232, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Positionsmarkierungen (20) von dem optoelektronischen Abtastsystem eines im wesentlichen handelsüblichen CD-Laufwerks erfaßbar sind.
- 20 234. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 233, *dadurch gekennzeichnet, daß* auf dem Träger eine Peptidbibliothek, insbesondere eine vorzugsweise vollständige 4-, 5-, 6- oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht ist.
235. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 233, *dadurch gekennzeichnet, daß* auf dem Träger eine Oligonukleotidbibliothek insbesondere eine vorzugsweise vollständige 12-, 13-, 14- oder 15mer Oligonukleotidbibliothek aufgebracht ist.

236. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 233, *dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Träger eine Aptamerbibliothek aufgebracht ist.*
237. Vorrichtung zum Aufbringen von Molekülen auf eine im wesentlichen ebene Oberfläche eines Trägers, insbesondere eines Trägers nach einem der Ansprüche 229 bis 236,
umfassend
- Mittel zur drehbaren Halterung des Trägers um eine zu der genannten Oberfläche des Trägers im wesentlichen senkrechte Drehachse,
 - Mittel zum Aufbringen verschiedener Flüssigkeiten auf die Oberfläche des Trägers im Bereich der Drehachse und
 - wenigstens einen relativ zum Träger verfahrbaren Laser zum Bestrahlen ausgewählter Bereiche des Trägers mit Laserlicht.
238. Vorrichtung zum Aufbringen von Molekülen auf eine im wesentlichen ebene Oberfläche eines Trägers, insbesondere eines Trägers nach einem der Ansprüche 229 bis 236, *umfassend* düsenartige Mittel zum Aufbringen kleinster Mengen auf dem Träger zu verankernder Moleküle, Mittel zum Verfahren der Mittel zum Aufbringen der Moleküle und des Trägers relativ zueinander und wenigstens einen Laser zur Bestrahlung ausgewählter Bereiche des Trägers mit Laserlicht.

Bezugszeichenliste

- 2 an den Träger gekoppelte Moleküle
- 3 Matrixschicht
- 4 Aggregate, die an an den Träger gekoppelte Moleküle binden
- 5 Substanzen
- 6 elektromagnetische Wellen
- 7 lokal engbegrenzter, ausgewählter Bereich
- 8 andere Moleküle, die mit an den Träger gekoppelten Molekülen (2), oder die mit Aggregaten an diese Moleküle (4) in Wechselwirkung treten
- 9 immobilisierte Substanzen
- 10 Oberseite
- 11 beweglich gemachte Substanzen
- 12 Träger
- 13 elektromagnetische Wellen oder angelegte Spannung
- 14 Moleküle
- 15 unterschiedliche Substanzen
- 16 Achse
- 17 Mischarray
- 18 Bewegungspfeil
- 19 Quellen elektromagnetischer Strahlung.
- 20 Pit
- 21 Isolator
- 22 Bewegungspfeil
- 23 Array von einzeln ansteuerbaren Detektoren

- 24 Fokussierlinse
25 größerer Bereich, der mehrere ausgewählte Bereiche (7) umfaßt
26 Laserstrahlen
27 Detektor
28 Detektor
29 Leuchtdiode, die gleichzeitig als Detektor verwendet werden kann
30 Linse
32 emittierte Lichtstrahlen
40 Array von Mikrolasern
42 Mikrolaser
44 Mikrolaser
46 Oberseite eines Trägers
48 Träger
50 Moleküle/-gruppe
52 Moleküle/-gruppe
54 Array von Detektoren
56 Detektor
58 Detektor
60 Wellenlängenfilter
62, 62' Anregungsstrahlung (Strahlung eines Miroklasers)
64 Lumineszenzstrahlung

Zusammenfassung

Verfahren und Vorrichtungen zur schnellen Erfassung optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten, von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, verbesserte Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen anzugeben; die zudem schnell sind und preisgünstig herstell- bzw. durchführbar sind.

Zur Lösung dieser Aufgabe werden verschiedene Verfahren und Vorrichtungen angegeben, wobei unter anderem eine handelsübliche CD (12) als Träger für die zu untersuchenden Moleküle (14) verwendet und das Signal-Rausch-Verhältnis bei Lumineszenz-Reaktionen dadurch verbessert wird, daß anregendes Licht (26) nicht mehr auf einen emittierten Licht (32) detektierenden Detektor (28) gelangen kann.

Eines der Verfahren benötigt keinerlei relativ zueinander bewegte Teile zur lithographischen Synthese und zum Auslesen von Bindeereignissen an die auf einem Träger aufgebrachte Molekülbibliothek, wodurch die Synthesegenaugigkeit, die Auslesegenaugigkeit und die Auslesegeschwindigkeit durch die kompakte Bauweise deutlich verbessert werden.

1/15

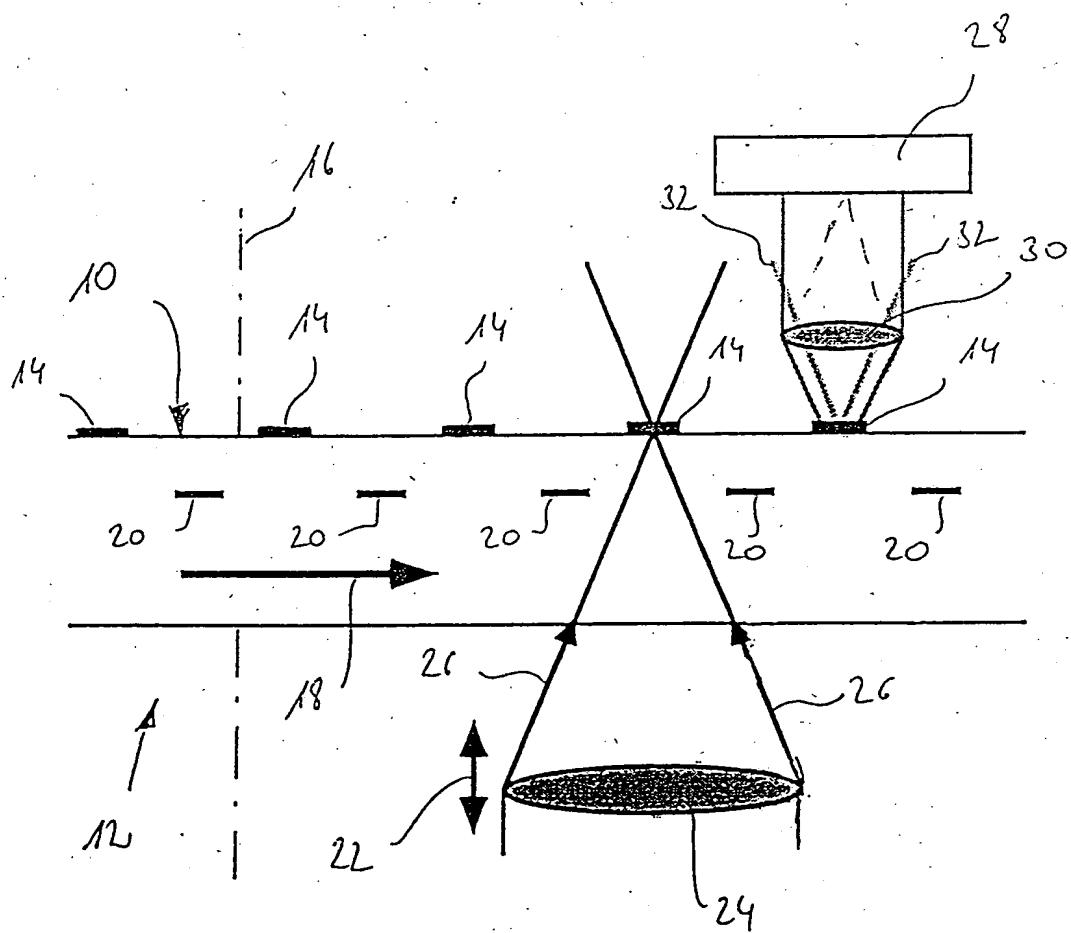


Fig. 1

2/15

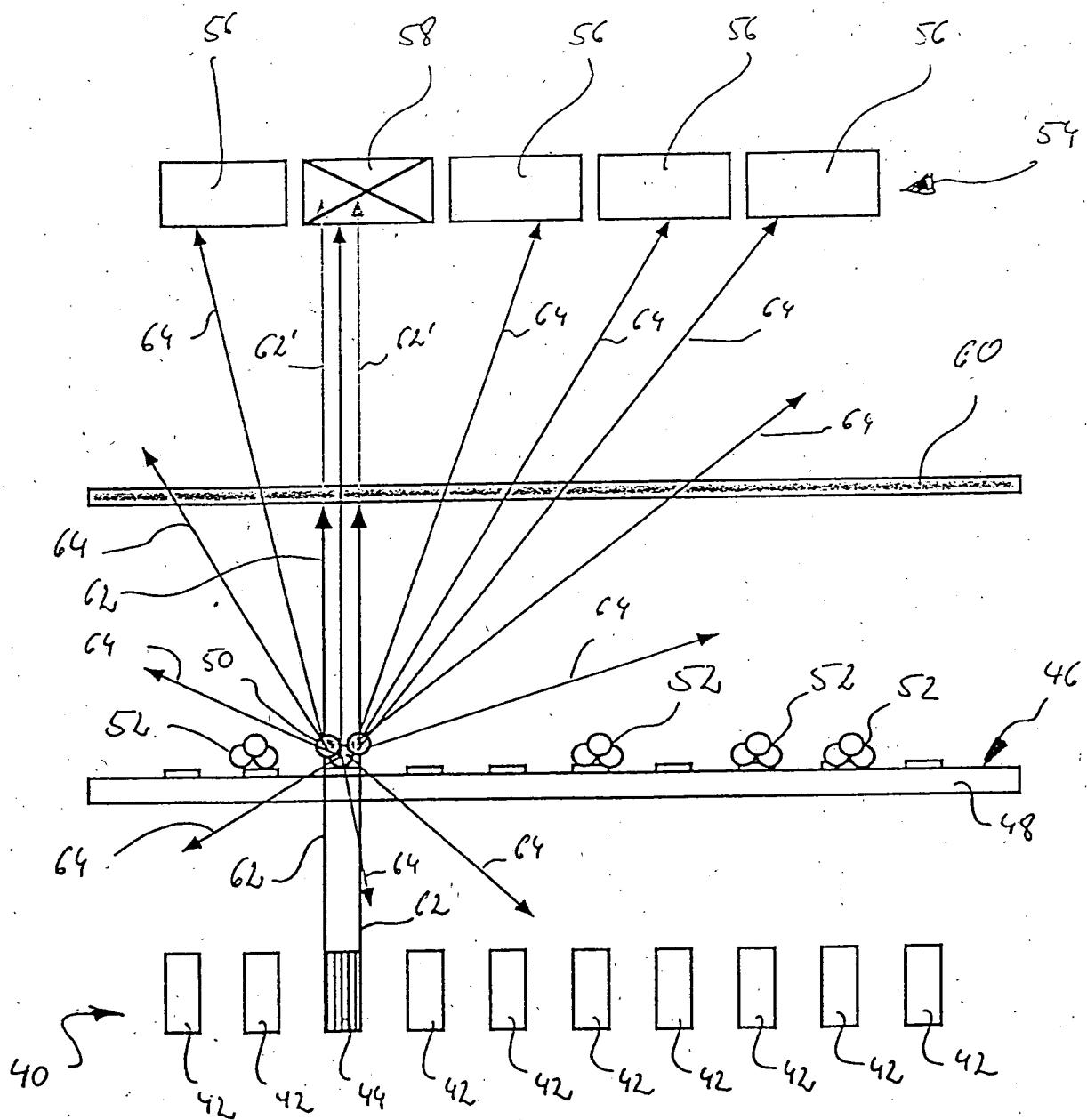


Fig. 2

3/15

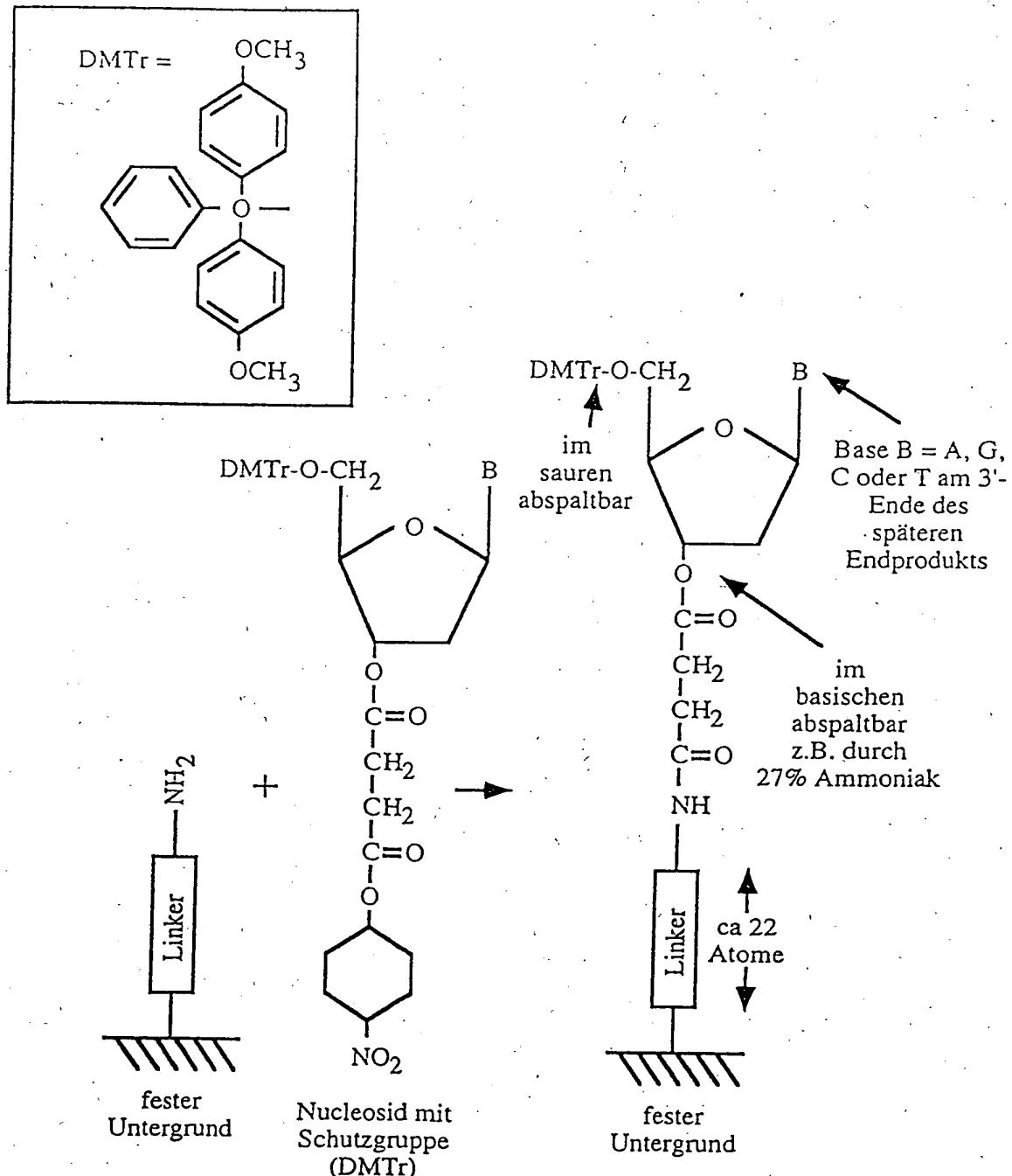
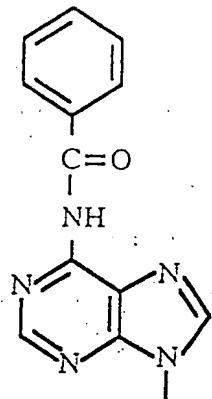
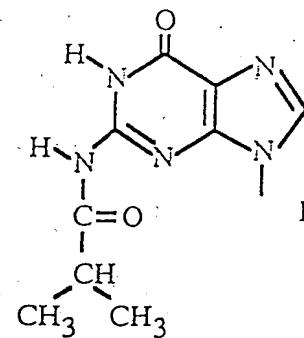


fig. 3

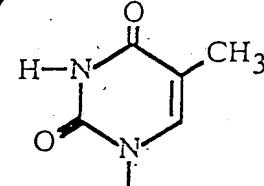
4/15



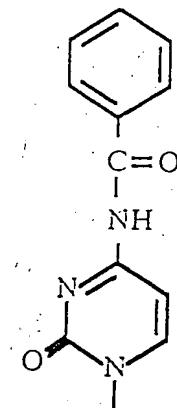
A(Bz) = Adenin
mit der
Schutzgruppe
Benzoyl -



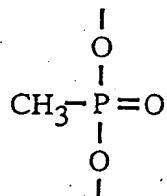
G(Ib) = Guanin
mit der
Schutzgruppe
Isobutyryl -



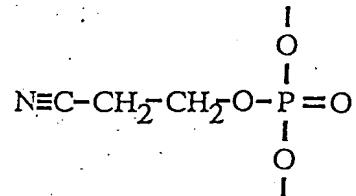
T= Thymin



C(Bz) = Cytosin
mit der
Schutzgruppe
Benzoyl -

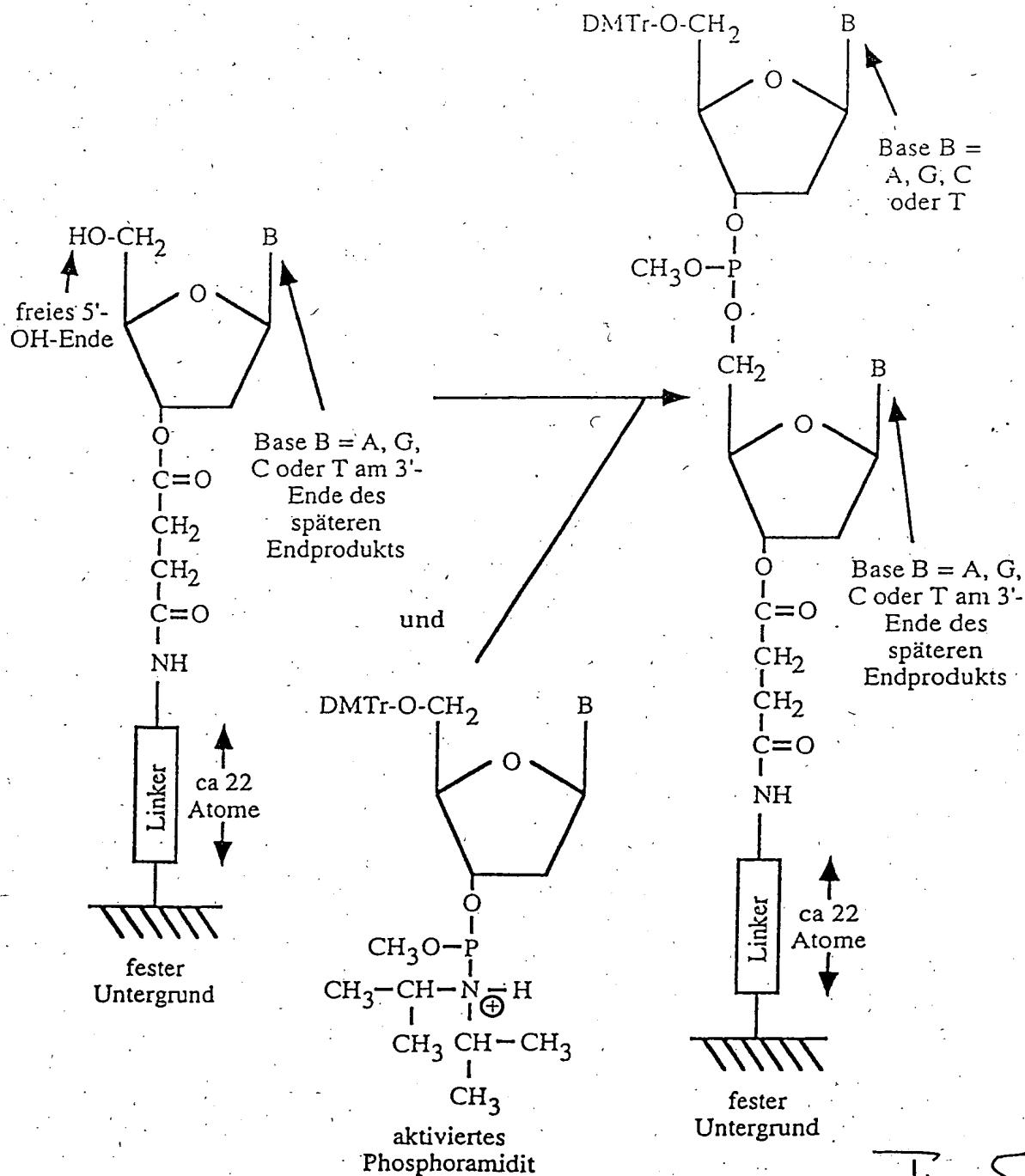


Phosphatgruppe
mit der
Schutzgruppe
Methoxy -

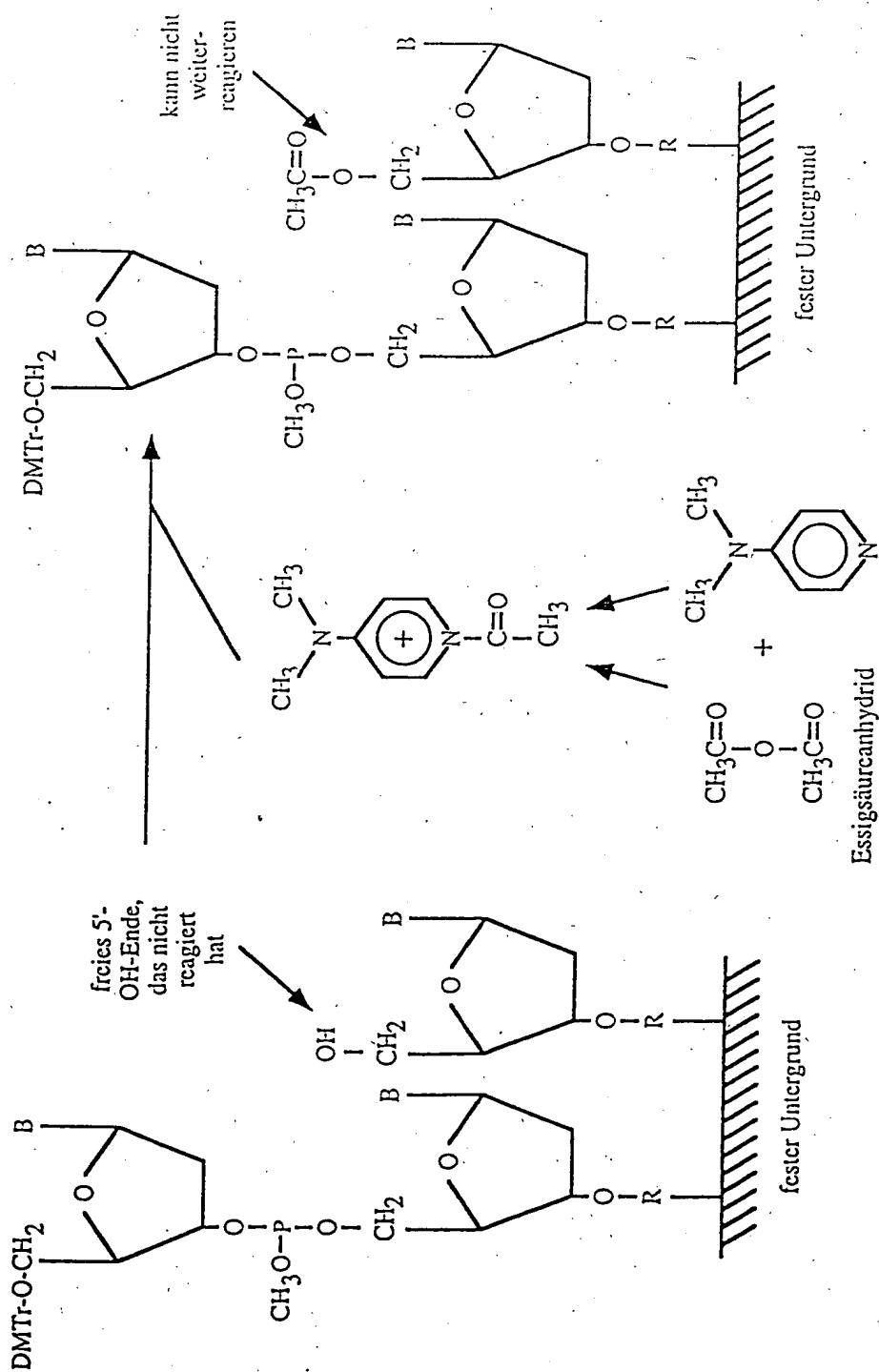


Phosphatgruppe
mit der
Schutzgruppe
Beta-cyanoethyl

Fig. 4



6/15



V. t. 6

7/15

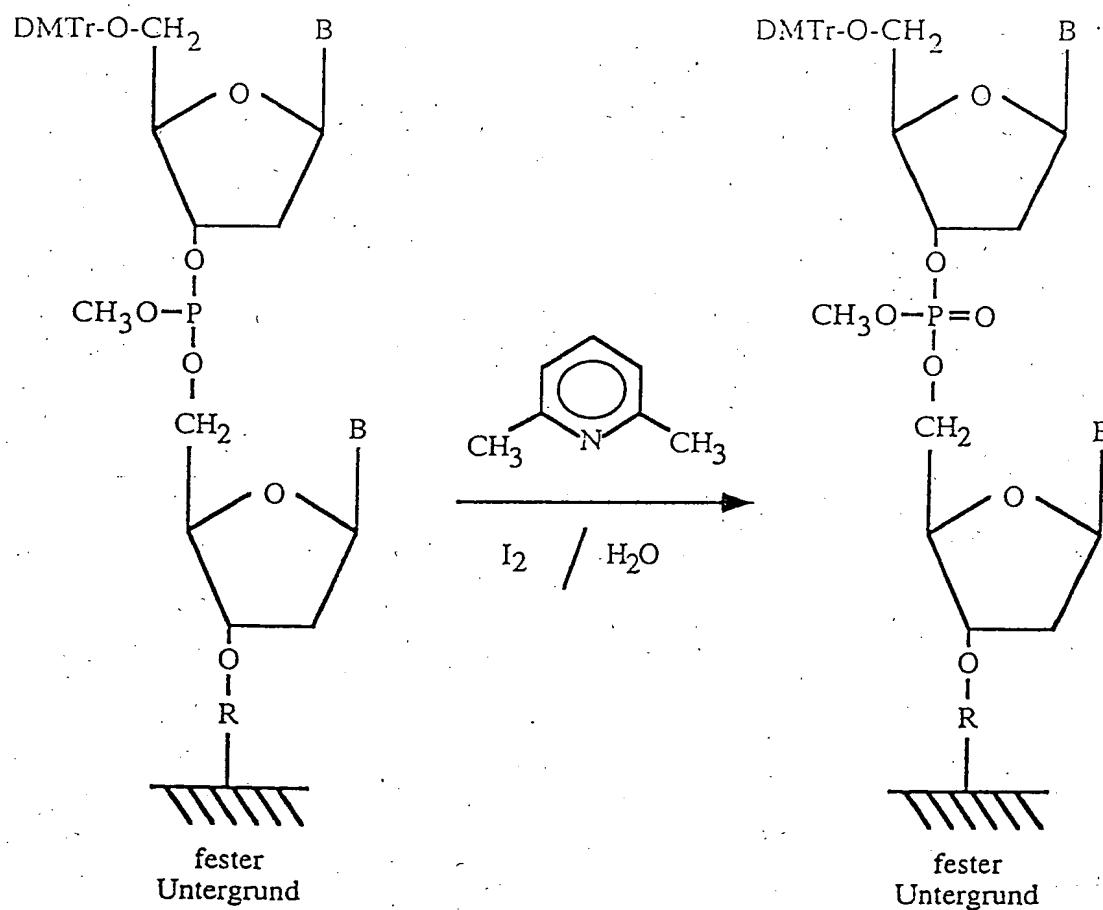


Fig. 7

M18

8/15

8/15

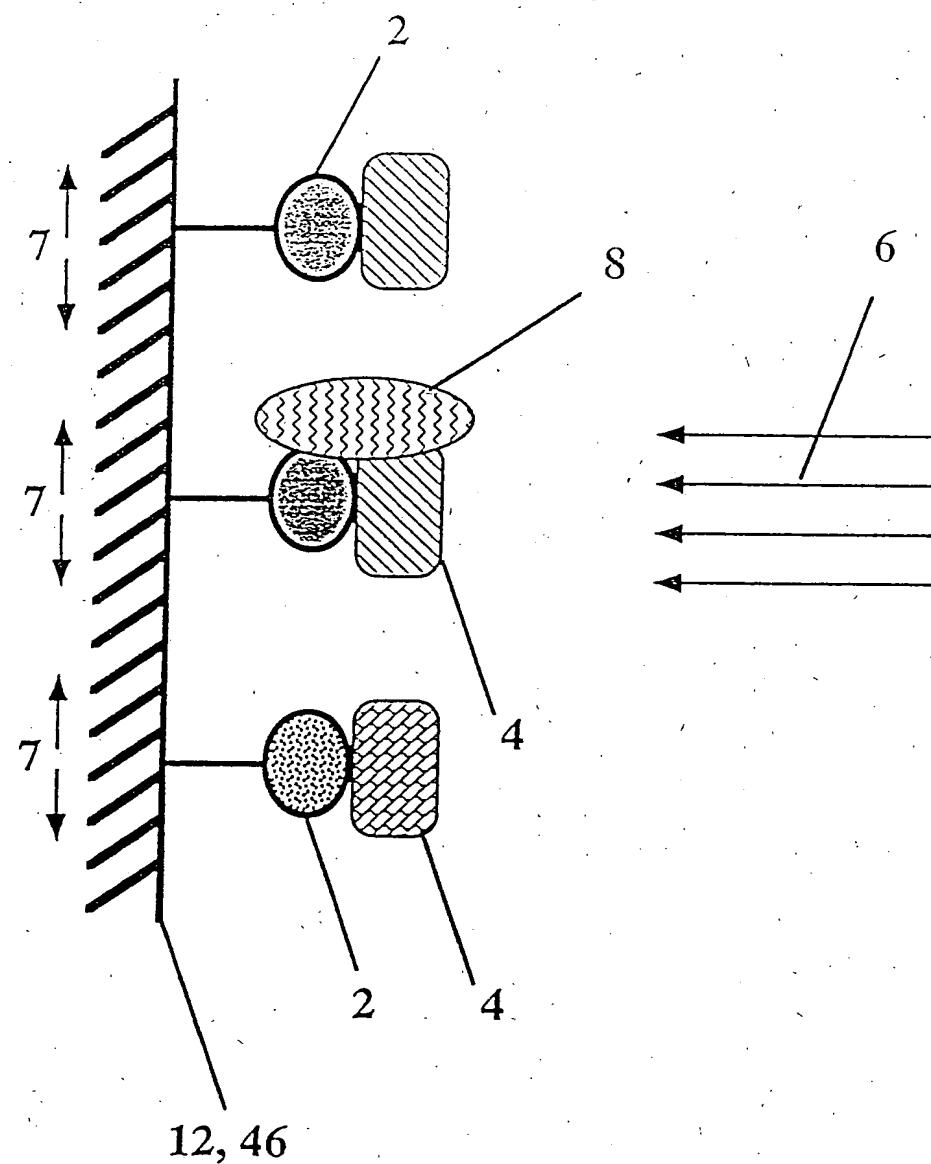


Fig. 8

9/15

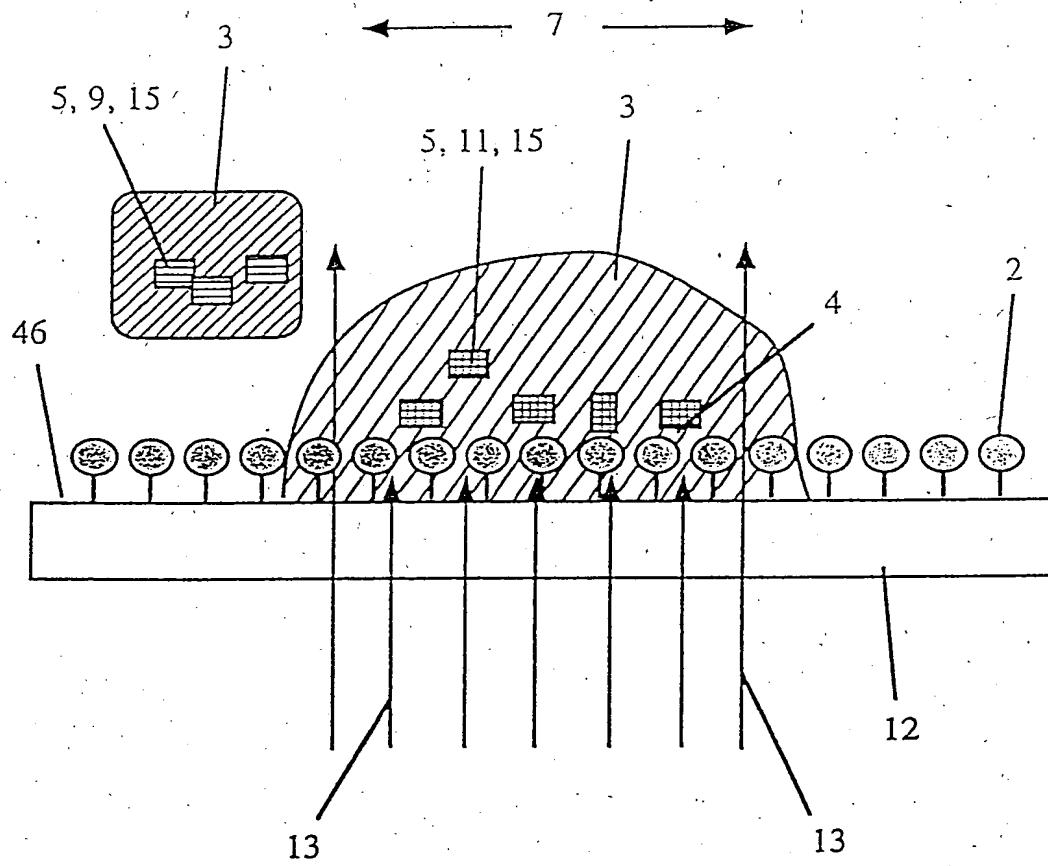


Fig. 9

120

10/15

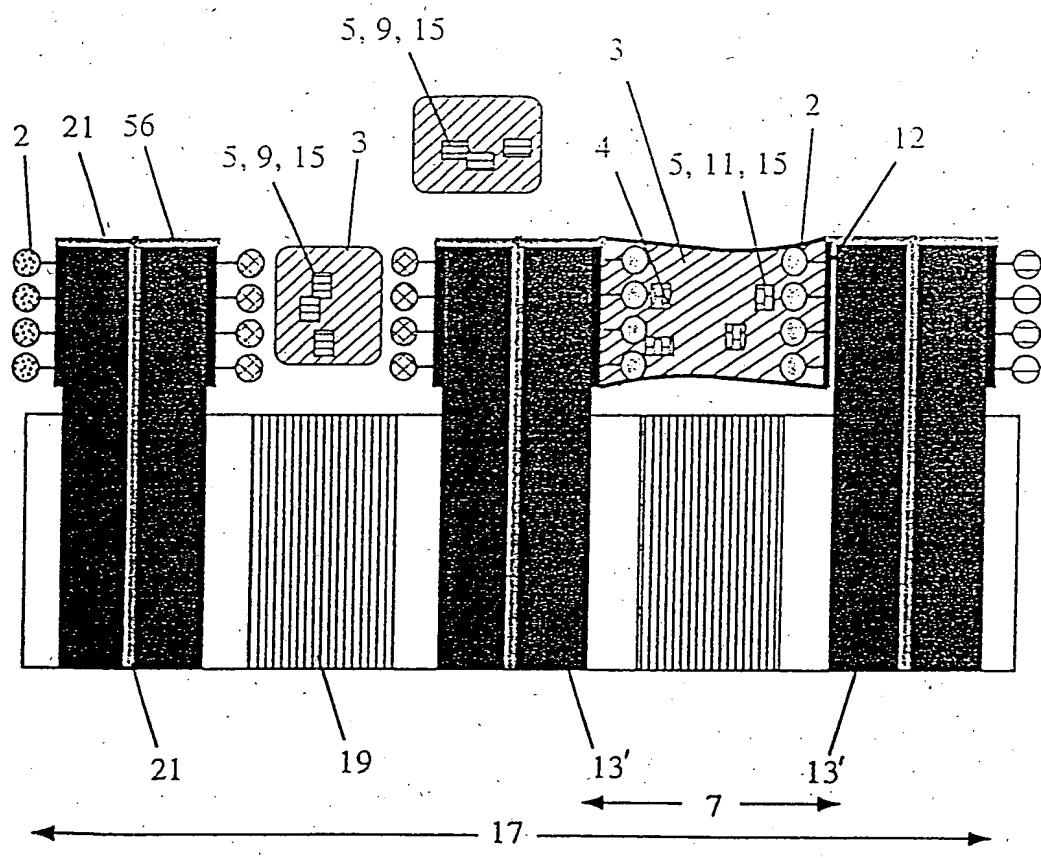


Fig 10

11/15.

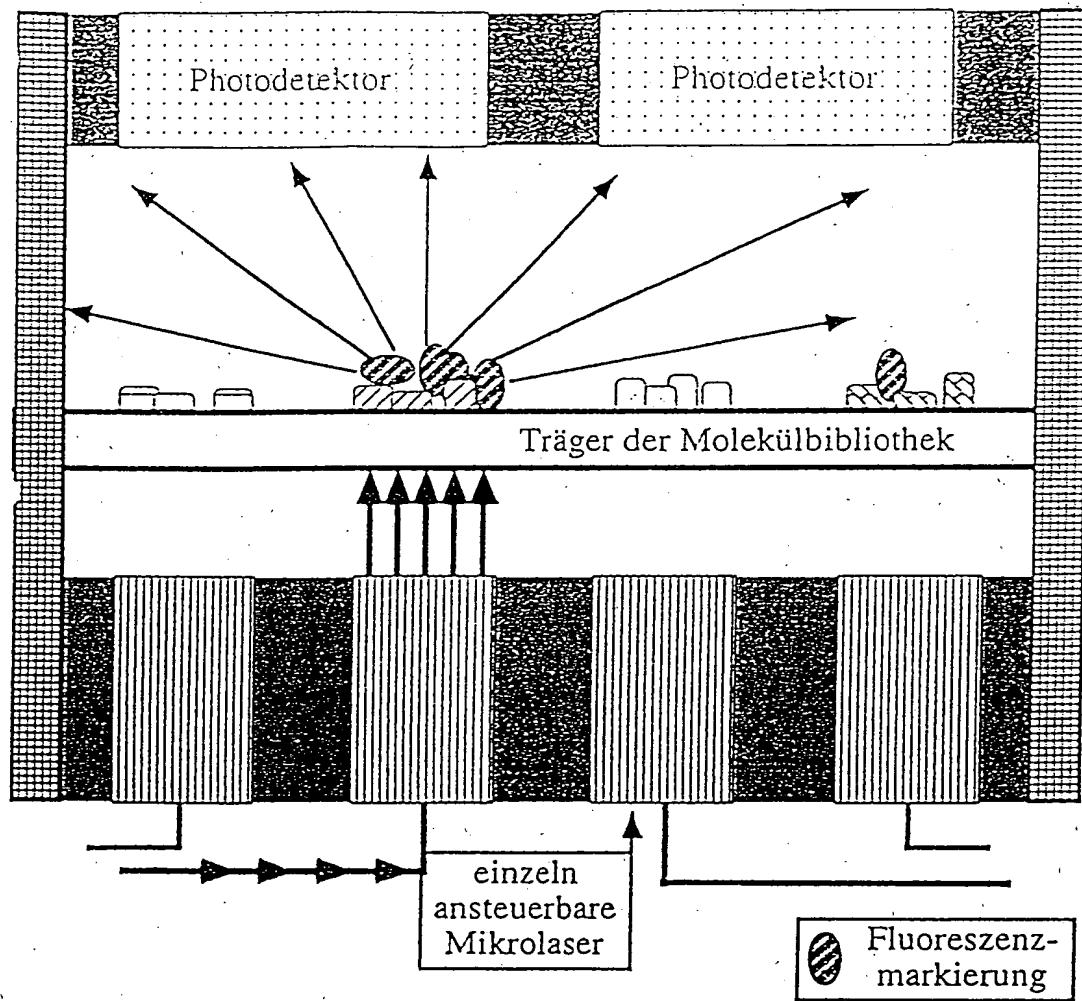


Fig 11

122

12/15

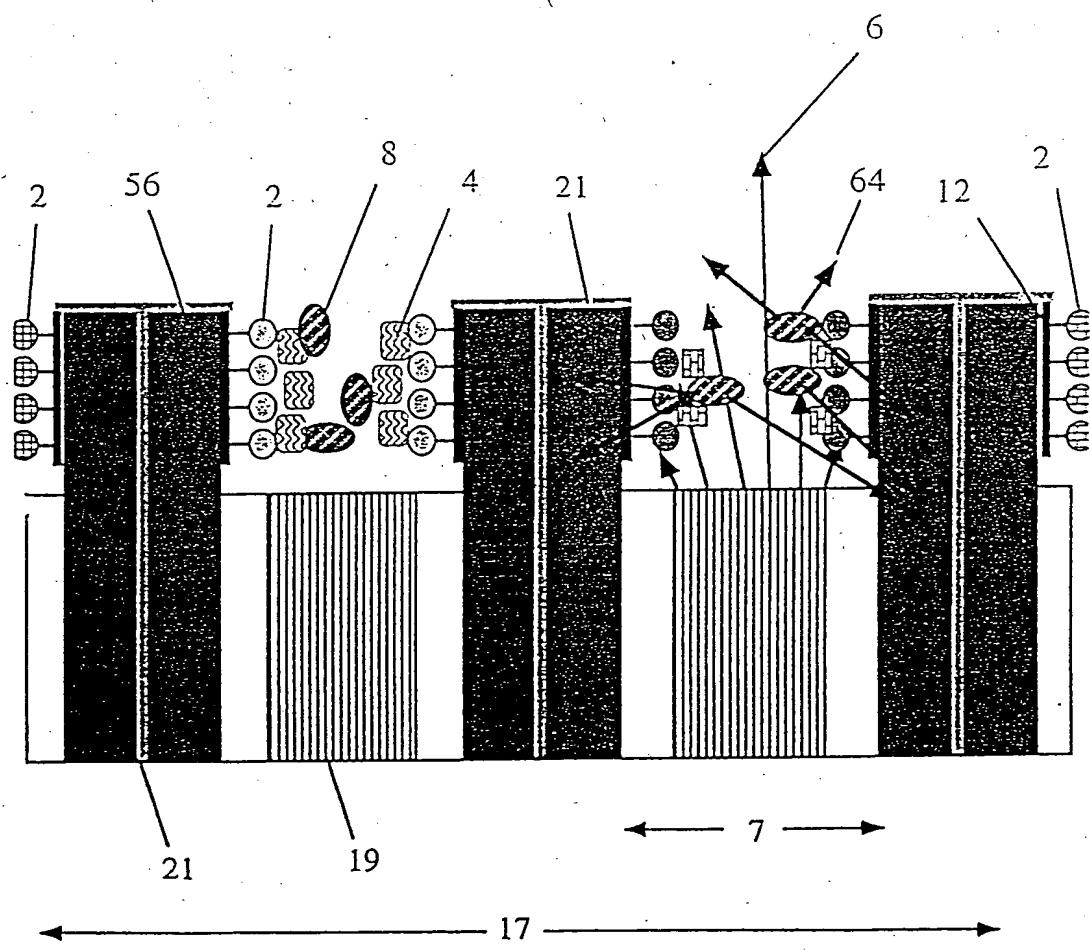


Fig. 12

Q3

13/15

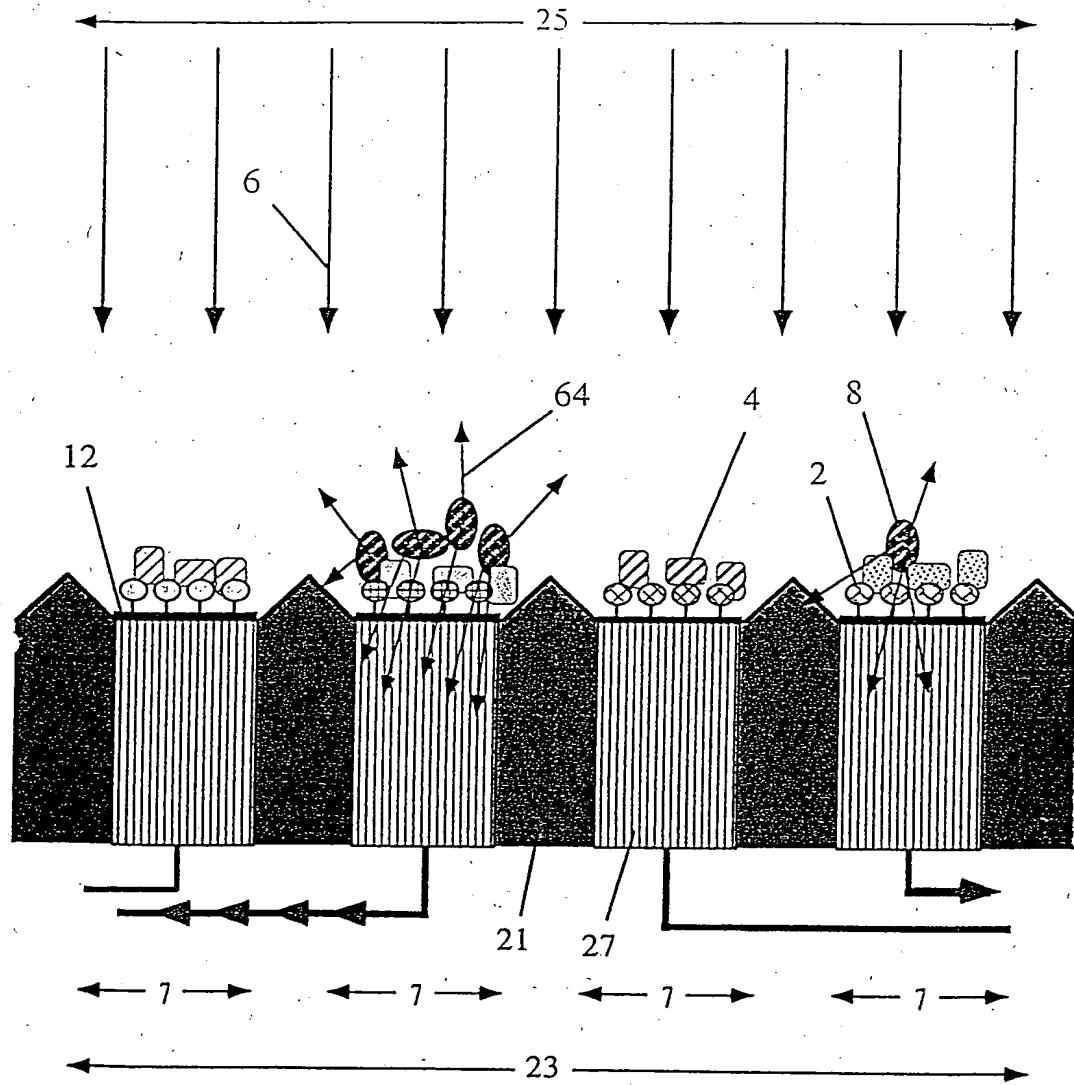


Fig. 13

124

14/15

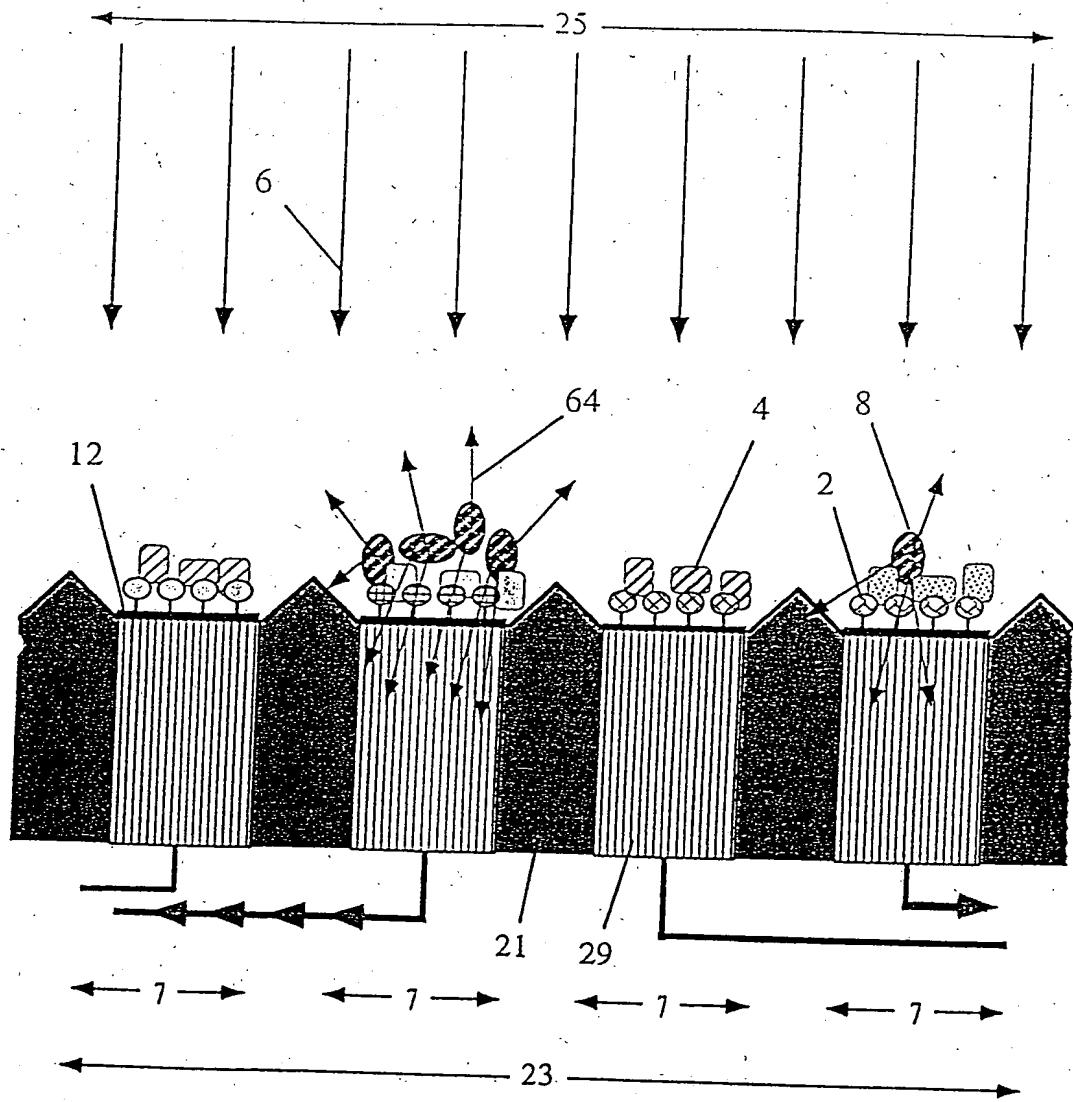
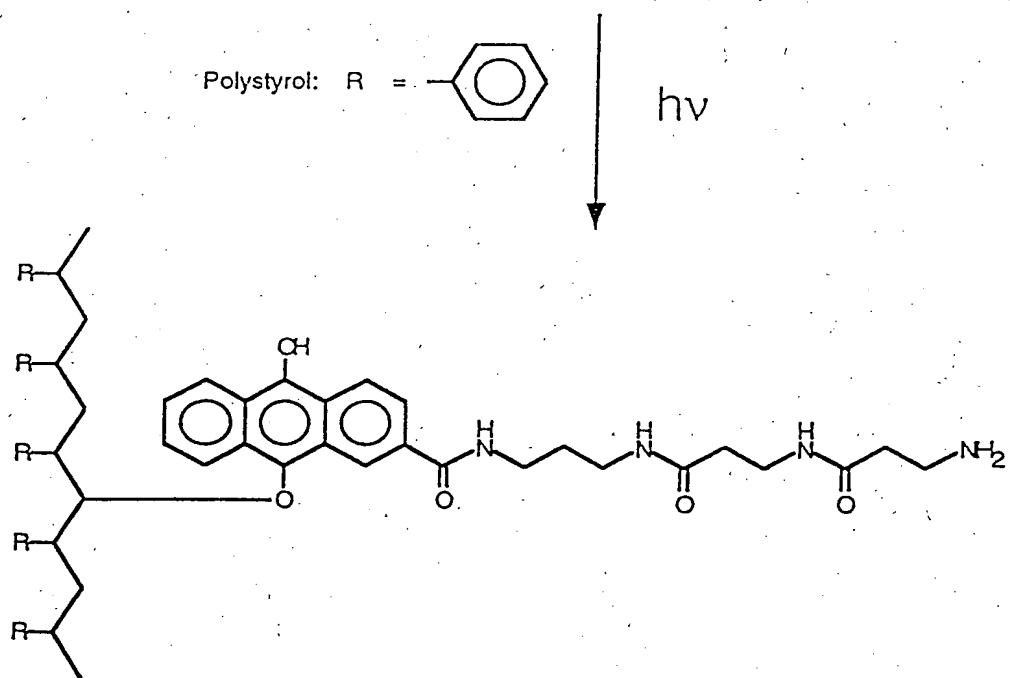
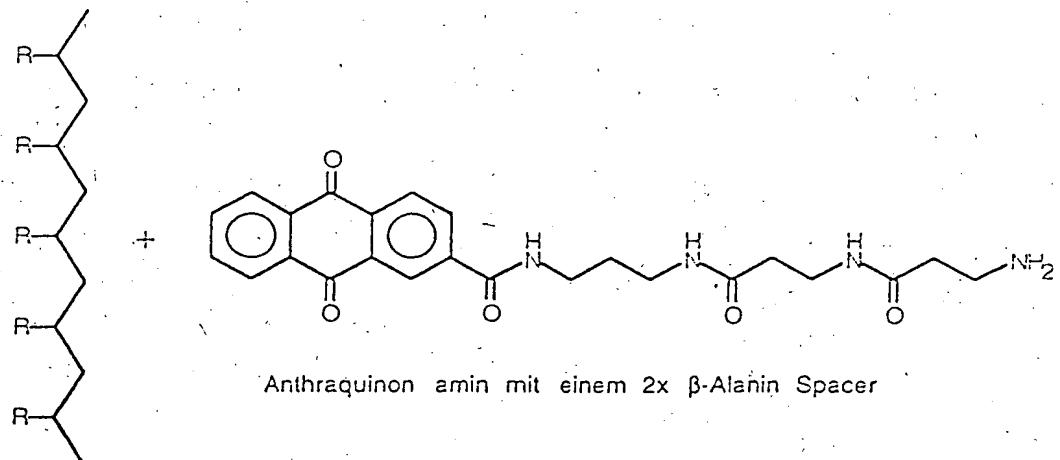


Fig. 14

15/15

Fig. 15

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.